

TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

PCT

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

(article 18 et règles 43 et 44 du PCT)

Référence du dossier du déposant ou du mandataire 339057/16893	POUR SUITE voir la notification de transmission du rapport de recherche internationale (formulaire PCT/ISA/220) et, le cas échéant, le point 5 ci-après A DONNER	
Demande internationale n° PCT/FR 98/00849	Date du dépôt international (jour/mois/année) 28/04/1998	(Date de priorité (la plus ancienne) (jour/mois/année) 28/04/1997
Déposant INSELM		

Le présent rapport de recherche internationale, établi par l'administration chargée de la recherche internationale, est transmis au déposant conformément à l'article 18. Une copie en est transmise au Bureau international.

Ce rapport de recherche internationale comprend 3 feilles.

Il est aussi accompagné d'une copie de chaque document relatif à l'état de la technique qui y est cité.

1. Il a été estimé que certaines revendications ne pouvaient pas faire l'objet d'une recherche (voir le cadre I).
2. Il y a absence d'unité de l'invention (voir le cadre II).
3. La demande internationale contient la divulgation d'un listage de séquence de nucléotides ou d'acides aminés et la recherche internationale a été effectuée sur la base du listage de séquence
 - déposé avec la demande internationale
 - fourni par le déposant séparément de la demande internationale
 - sans être accompagnée d'une déclaration selon laquelle il n'inclut pas d'éléments allant au-delà de la divulgation faite dans la demande internationale telle qu'elle a été déposée.
 - transcrit par l'administration
4. En ce qui concerne le titre, le texte est approuvé tel qu'il a été remis par le déposant.
 - Le texte a été établi par l'administration et a la teneur suivante:
5. En ce qui concerne l'abrégué,
 - le texte est approuvé tel qu'il a été remis par le déposant
 - le texte (reproduit dans le cadre III) a été établi par l'administration conformément à la règle 38.2b). Le déposant peut présenter des observations à l'administration dans un délai d'un mois à compter de la date d'expédition du présent rapport de recherche internationale.
6. La figure des dessins à publier avec l'abrégué est la suivante:

Figure n° _____

 - suggérée par le déposant.
 - parce que le déposant n'a pas suggéré de figure.
 - parce que cette figure caractérise mieux l'invention.

Aucune des figures n'est à publier.

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Recherche internationale No
PCT/FR 98/00849

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
CIB 6 C12N15/86 C12N15/11 //C12N15/67

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 6 C12N

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	WO 96 01324 A (INSERM) 18 janvier 1996	1, 2, 8-11, 17-22
A	voir le document en entier ---	3-7, 12-15
X	WO 94 05786 A (BEIERSDORF AG) 17 mars 1994 voir abrégé voir page 5, ligne 9 - page 6, ligne 7 voir page 9, ligne 29 - page 15, ligne 13 voir revendications 1-18 ---	1, 2, 8, 17-22
X	WO 94 05785 A (BEIERSDORF AG) 17 mars 1994 voir abrégé voir page 9, ligne 29 - page 22, ligne 20 ---	1, 2, 8, 17-22
		-/-

Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

° Catégories spéciales de documents cités:

- "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- "E" document antérieur, mais publié à la date du dépôt international ou après cette date
- "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

"&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

1 septembre 1998

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

15/09/1998

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Panzica, G

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No
PCT/FR 98/00849

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	WO 93 03143 A (ANDERSON W. ET AL.) 18 février 1993 cité dans la demande voir abrégé voir page 1 - page 3 voir page 5 - page 9 * revendications * ---	1-23
A	US 5 112 767 A (ROY-BURMAN PRADIP ET AL.) 12 mai 1992 ---	13
A	WO 93 05815 A (FILLER AARON GERSHON ;LEVER ANDREW M L (GB)) 1 avril 1993 ---	24
A	WO 96 15813 A (UNIV MASSACHUSETTS MEDICAL CENTER; QUESENBERRY PETER J. (US)) 30 mai 1996 -----	24

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 98/00849

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
WO 9601324	A 18-01-1996	FR 2722208 A		12-01-1996
		AU 2929595 A		25-01-1996
		CA 2194155 A		18-01-1996
		EP 0769062 A		23-04-1997
		JP 10503644 T		07-04-1998
WO 9405786	A 17-03-1994	DE 4228457 A		28-04-1994
		AU 4953893 A		29-03-1994
		EP 0658199 A		21-06-1995
		JP 8502884 T		02-04-1996
		US 5665567 A		09-09-1997
WO 9405785	A 17-03-1994	DE 4228458 A		01-06-1994
		AU 4953793 A		29-03-1994
		EP 0658198 A		21-06-1995
		JP 8502644 T		26-03-1996
WO 9303143	A 18-02-1993	CA 2114416 A		18-02-1993
		EP 0598029 A		25-05-1994
		JP 6509713 T		02-11-1994
US 5112767	A 12-05-1992	NONE		
WO 9305815	A 01-04-1993	AU 669128 B		30-05-1996
		AU 2567992 A		27-04-1993
		CA 2119145 A		01-04-1993
		EP 0610232 A		17-08-1994
		EP 0640350 A		01-03-1995
		JP 7501793 T		23-02-1995
WO 9615813	A 30-05-1996	US 5665350 A		09-09-1997
		AU 4378996 A		17-06-1996

**PCT
REQUEST**

The undersigned requests that the present
international application be processed
according to the Patent Cooperation Treaty.

28 DEC 1998

receiving Office use only

International Application No.

International Filing Date

Name of receiving Office and "PCT International Application"

Applicant's or agent's file reference
(if desired) (12 characters maximum) 339057/16893

Box No. I TITLE OF INVENTION

New Internal Ribosome Entry Site and Vector Containing It

Box No. II APPLICANT

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country.) The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)

INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET
DE LA RECHERCHE MEDICALE (INSERM)
101, rue de Tolbiac
75013 PARIS
FRANCE

This person is also inventor.

Telephone No.

Facsimile No.

Teleprinter No.

State (that is, country) of nationality: FR

State (that is, country) of residence: FR

This person is applicant all designated States all designated States except the United States of America the United States of America only the States indicated in the Supplemental Box

BOX No. III FURTHER APPLICANT(S) AND/OR (FURTHER) INVENTOR(S)

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country.) The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)

LOPEZ LASTRA Marcelo
34 rue de Bourg
69007 LYON
FRANCE

This person is:

applicant only

applicant and inventor

inventor only (If this check-box is marked, do not fill in below.)

State (that is, country) of nationality: CL

State (that is, country) of residence: FR

This person is applicant all designated States all designated States except the United States of America the United States of America only the States indicated in the Supplemental Box

Further applicants and/or (further) inventors are indicated on a continuation sheet.

BOX No. IV AGENT OR COMMON REPRESENTATIVE; OR ADDRESS FOR CORRESPONDENCE

The person identified below is hereby/has been appointed to act on behalf of the applicant(s) before the competent International Authorities as:

agent

common representative

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country.)

MARTIN Jean-Jacques, SCHRIMPF Robert, AHNER Francis,
WARCOIN Jacques, TEXIER Christian, LE FORESTIER Eric
CABINET REGIMBEAU
26 Avenue Kleber
75116 PARIS
FRANCE

Telephone No.

01 45009202

Facsimile No.

01 45004612

Teleprinter No.

Address for correspondence: Mark this check-box where no agent or common representative is/has been appointed and the space above is used instead to indicate a special address to which correspondence should be sent.

Continuation of Box No. III FURTHER APPLICANT(S) AND/OR (FURTHER) INVENTOR(S)

If none of the following sub-boxes is used, this sheet is not to be included in the request.

Name and address: *(Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country.) The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)*

GABUS-DARLIX Caroline
Les Genêts II
69630 CHAPONOST
FRANCE

This person is:

applicant only
 applicant and inventor
 inventor only *(If this check-box is marked, do not fill in below.)*

State *(that is, country)* of nationality: FRState *(that is, country)* of residence: FR

This person is applicant all designated all designated States except the United States of America the United States of America only the States indicated in the Supplemental Box for the purposes of States

Name and address: *(Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country.) The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)*

DARLIX Jean-Luc
Les Genêts II
69630 CHAPONOST
FRANCE

This person is:

applicant only
 applicant and inventor
 inventor only *(If this check-box is marked, do not fill in below.)*

State *(that is, country)* of nationality: FRState *(that is, country)* of residence: FR

This person is applicant all designated all designated States except the United States of America the United States of America only the States indicated in the Supplemental Box for the purposes of States

Name and address: *(Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country.) The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)*

This person is:

applicant only
 applicant and inventor
 inventor only *(If this check-box is marked, do not fill in below.)*

State *(that is, country)* of nationality:State *(that is, country)* of residence:

This person is applicant all designated all designated States except the United States of America the United States of America only the States indicated in the Supplemental Box for the purposes of States

Name and address: *(Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country.) The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)*

This person is:

applicant only
 applicant and inventor
 inventor only *(If this check-box is marked, do not fill in below.)*

State *(that is, country)* of nationality:State *(that is, country)* of residence:

This person is applicant all designated all designated States except the United States of America the United States of America only the States indicated in the Supplemental Box for the purposes of States

Further applicants and/or (further) inventors are indicated on a continuation sheet.

Box No. V DESIGNATION OF STATES

The following designations are hereby made under Rule 4.9(a) (mark the applicable check-boxes; at least one must be marked):

Regional Patent

AP **ARIPO Patent:** **GH** Ghana, **GM** Gambia, **KE** Kenya, **LS** Lesotho, **MW** Malawi, **SD** Sudan, **SZ** Swaziland, **UG** Uganda, **ZW** Zimbabwe, and any other State which is a Contracting State of the Harare Protocol and of the PCT

EA **Eurasian Patent:** **AM** Armenia, **AZ** Azerbaijan, **BY** Belarus, **KG** Kyrgyzstan, **KZ** Kazakhstan, **MD** Republic of Moldova, **RU** Russian Federation, **TJ** Tajikistan, **TM** Turkmenistan, and any other State which is a Contracting State of the Eurasian Patent Convention and of the PCT

EP **European Patent:** **AT** Austria, **BE** Belgium, **CH** and **LI** Switzerland and Liechtenstein, **CY** Cyprus, **DE** Germany, **DK** Denmark, **ES** Spain, **FI** Finland, **FR** France, **GB** United Kingdom, **GR** Greece, **IE** Ireland, **IT** Italy, **LU** Luxembourg, **MC** Monaco, **NL** The Netherlands, **PT** Portugal, **SE** Sweden, and any other State which is a Contracting State of the European Patent Convention and of the PCT

OA **OAPI Patent:** **BF** Burkina Faso, **BJ** Benin, **CF** Central African Republic, **CG** Congo, **CI** Côte d'Ivoire, **CM** Cameroon, **GA** Gabon, **GN** Guinea, **ML** Mali, **MR** Mauritania, **NE** Niger, **SN** Senegal, **TD** Chad, **TG** Togo, and any other State which is a member State of OAPI and a Contracting State of the PCT (*if other kind of protection or treatment desired, specify on dotted line*)

National Patent (if other kind of protection or treatment desired, specify on dotted line):

<input type="checkbox"/> AL Albania	<input type="checkbox"/> LS Lesotho
<input type="checkbox"/> AM Armenia	<input type="checkbox"/> LT Lithuania
<input type="checkbox"/> AT Austria	<input type="checkbox"/> LU Luxembourg
<input checked="" type="checkbox"/> AU Australia	<input type="checkbox"/> LV Latvia
<input type="checkbox"/> AZ Azerbaijan	<input type="checkbox"/> MD Republic of Moldova
<input type="checkbox"/> BA Bosnia and Herzegovina	<input type="checkbox"/> MG Madagascar
<input type="checkbox"/> BB Barbados	<input type="checkbox"/> MK The former Yugoslav Republic of Macedonia
<input type="checkbox"/> BG Bulgaria	<input type="checkbox"/> MN Mongolia
<input type="checkbox"/> BR Brazil	<input type="checkbox"/> MW Malawi
<input type="checkbox"/> BY Belarus	<input type="checkbox"/> MX Mexico
<input checked="" type="checkbox"/> CA Canada	<input type="checkbox"/> NO Norway
<input type="checkbox"/> CH and LI Switzerland and Liechtenstein	<input type="checkbox"/> NZ New Zealand
<input type="checkbox"/> CN China	<input type="checkbox"/> PL Poland
<input type="checkbox"/> CU Cuba	<input type="checkbox"/> PT Portugal
<input type="checkbox"/> CZ Czech Republic	<input type="checkbox"/> RO Romania
<input type="checkbox"/> DE Germany	<input type="checkbox"/> RU Russian Federation
<input type="checkbox"/> DK Denmark	<input type="checkbox"/> SD Sudan
<input type="checkbox"/> EE Estonia	<input type="checkbox"/> SE Sweden
<input type="checkbox"/> ES Spain	<input type="checkbox"/> SG Singapore
<input type="checkbox"/> FI Finland	<input type="checkbox"/> SI Slovenia
<input type="checkbox"/> GB United Kingdom	<input type="checkbox"/> SK Slovakia
<input type="checkbox"/> GE Georgia	<input type="checkbox"/> SL Sierra Leone
<input type="checkbox"/> GH Ghana	<input type="checkbox"/> TJ Tajikistan
<input type="checkbox"/> GM Gambia	<input type="checkbox"/> TM Turkmenistan
<input type="checkbox"/> GW Guinea-Bissau	<input type="checkbox"/> TR Turkey
<input type="checkbox"/> HR Croatia	<input type="checkbox"/> TT Trinidad and Tobago
<input type="checkbox"/> HU Hungary	<input type="checkbox"/> UA Ukraine
<input type="checkbox"/> ID Indonesia	<input type="checkbox"/> UG Uganda
<input type="checkbox"/> IL Israel	<input checked="" type="checkbox"/> US United States of America
<input type="checkbox"/> IS Iceland	
<input checked="" type="checkbox"/> JP Japan	<input type="checkbox"/> UZ Uzbekistan
<input type="checkbox"/> KE Kenya	<input type="checkbox"/> VN Viet Nam
<input type="checkbox"/> KG Kyrgyzstan	<input type="checkbox"/> YU Yugoslavia
<input type="checkbox"/> KP Democratic People's Republic of Korea	<input type="checkbox"/> ZW Zimbabwe
<input type="checkbox"/> KR Republic of Korea	
<input type="checkbox"/> KZ Kazakhstan	
<input type="checkbox"/> LC Saint Lucia	
<input type="checkbox"/> LK Sri Lanka	
<input type="checkbox"/> LR Liberia	

Precautionary Designation Statement: In addition to the designations made above, the applicant also makes under Rule 4.9(b) all other designations which would be permitted under the PCT except the designation(s) indicated in the Supplemental Box as being excluded from the scope of this statement. The applicant declares that those additional designations are subject to confirmation and that any designation which is not confirmed before the expiration of 15 months from the priority date is to be regarded as withdrawn by the applicant at the expiration of that time limit. *(Confirmation of a designation consists of the filing of a notice specifying that designation and the payment of the designation and confirmation fees. Confirmation must reach the receiving Office within the 15-month time limit.)*

Box No. VI PRIORITY CLAIM		<input type="checkbox"/> Further priority claims are indicated in the Supplemental Box.		
Filing date of earlier application (day/month/year)	Number of earlier application	Where earlier application is:		
		national application: country	regional application: * regional Office	international application: receiving Office
item (1) 28 April 1997 (28/04/97)	97 05203	FRANCE		
item (2)				
item (3)				

The receiving Office is hereby requested to prepare and transmit to the International Bureau a certified copy of the earlier application(s) (only if the earlier application was filed with the Office which for the purposes of the present international application is the receiving Office) identified above as item(s): VI

* Where the earlier application is an ARIPO application, it is mandatory to indicate in the Supplemental Box at least one country party to the Paris Convention for the Protection of Industrial Property for which that earlier application was filed (Rule 4.10(b)(ii)). See Supplemental Box.

Box No. VII INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

Choice of International Searching Authority (ISA) (if two or more International Searching Authorities are competent to carry out the international search, indicate the Authority chosen; the two-letter code may be used):

ISA /

Request to use results of earlier search; reference to that search (if an earlier search has been carried out by or requested from the International Searching Authority):

Date (day/month/year): Number: Country (or regional Office)
30 January 1998 FA 544307 EP

Box No. VIII CHECK LIST; LANGUAGE OF FILING

This international application contains the following number of sheets:

request	:	4
description (excluding sequence listing part)	:	36
claims	:	5
abstract	:	1
drawings	:	5
sequence listing part of description	:	
Total number of sheets		51

This international application is accompanied by the item(s) marked below:

- 5x. fee calculation sheet
- 12. separate signed power of attorney TO FOLLOW
- 23. copy of general power of attorney; reference number if any:
- 24. statement explaining lack of signature
- 48. priority document(s) identified in Box No. VI as item(s):
- 6. translation of international application into (language):
- 27. separate indications concerning deposited microorganism or other biological material
- 78. nucleotide and/or amino acid sequence listing in computer readable form
- 49. other (specify): Copy of Search Report

Figure of the drawings which should accompany the abstract:

Language of filing of the international application:

Box. No. IX SIGNATURE OF APPLICANT OR AGENT

Next to each signature, indicate the name of the person signing and the capacity in which the person signs (if such capacity is not obvious from reading the request).

CABINET REGIMBEAU
Counsels in Industrial Property
26, Avenue Kleber
75116 PARIS, FRANCE

WARCOIN Jacques

For receiving Office use only

1. Date of actual receipt of the purported international application:	2. Drawings:	
3. Corrected date of actual receipt due to later but timely received papers or drawings completing the purported international application:	<input type="checkbox"/> received: <input type="checkbox"/> not received:	
4. Date of timely receipt of the required corrections under PCT Article 11(2):		
5. International Searching Authority (if two or more are competent):	ISA/	6. <input type="checkbox"/> Transmittal of search copy delayed until search fee is paid

For International Bureau use only

Date of receipt of the record copy by the International Bureau:

28 Rec'd PCT PCT 28 DEC 1998

Réserve à l'office récepteur

REQUETE

Le soussigné requiert que la présente demande internationale soit traitée conformément au Traité de coopération en matière de brevets.

Demande internationale n°

Date du dépôt international

Nom de l'office récepteur et "Demande internationale PCT"

Référence du dossier du déposant ou du mandataire (facultatif)
(12 caractères au maximum) 339057/16893

Cadre n° I TITRE DE L'INVENTION

NOUVEAU SITE INTERNE D'ENTREE DES RIBOSOMES ET VECTEUR LE CONTENANT

Cadre n° II DEPOSANT

Nom et adresse : (Nom de famille suivi du prénom; pour une personne morale, désignation officielle complète. L'adresse doit comprendre le code postal et le nom du pays. Le pays de l'adresse indiquée dans ce cadre est l'Etat où le déposant a son domicile si aucun domicile n'est indiqué ci-dessous.)

INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE (INSERM)
101, rue de Tolbiac
75013 PARIS
FRANCE

Cette personne est aussi inventeur.

n° de téléphone

n° de télécopieur

n° de télécopieur

Nationalité (nom de l'Etat) :
FR

Domicile (nom de l'Etat) :
FR

Cette personne est déposant pour : tous les Etats désignés tous les Etats désignés sauf les Etats-Unis d'Amérique les Etats-Unis d'Amérique seulement les Etats indiqués dans le cadre supplémentaire

Cadre n° III AUTRE(S) DEPOSANT(S) OU (AUTRE(S)) INVENTEUR(S)

Nom et adresse : (Nom de famille suivi du prénom; pour une personne morale, désignation officielle complète. L'adresse doit comprendre le code postal et le nom du pays. Le pays de l'adresse indiquée dans ce cadre est l'Etat où le déposant a son domicile si aucun domicile n'est indiqué ci-dessous.)

LOPEZ LASTRA Marcelo
34 rue de Bourg
69007 LYON
FRANCE

Cette personne est :

déposant seulement

déposant et inventeur

inventeur seulement
(Si cette case est cochée,
ne pas remplir la suite.)

Nationalité (nom de l'Etat) :
CL

Domicile (nom de l'Etat) :
FR

Cette personne est déposant pour : tous les Etats désignés tous les Etats désignés sauf les Etats-Unis d'Amérique les Etats-Unis d'Amérique seulement les Etats indiqués dans le cadre supplémentaire

D'autres déposants ou inventeurs sont indiqués sur une feuille annexe.

Cadre n° IV MANDATAIRE OU REPRESENTANT COMMUN; OU ADRESSE POUR LA CORRESPONDANCE

La personne dont l'identité est donnée ci-dessous est/a été désignée pour agir au nom du ou des déposants auprès des autorités internationales compétentes, comme: mandataire représentant commun

Nom et adresse : (Nom de famille suivi du prénom; pour une personne morale, désignation officielle complète. L'adresse doit comprendre le code postal et le nom du pays.)

MARTIN Jean-Jacques, SCHRIMPFF Robert, AHNER Francis,
WARCOIN Jacques, TEXIER Christian, LE FORESTIER Eric
CABINET REGIMBEAU
25 Avenue Kléber
75116 PARIS
FRANCE

n° de téléphone

01 45 00 92 02

n° de télécopieur

01 45 00 46 12

n° de télécopieur

Cocher cette case lorsque aucun mandataire ni représentant commun n'est/a été désigné et que l'espace ci-dessus est utilisé pour indiquer une adresse spéciale à laquelle la correspondance doit être envoyée.

18 JUIN 1998

Feuille n°. 2 . . .

Suite du cadre n° III AUTRES DEPOSANTS OU (AUTRES) INVENTEURS

Si aucun des sous-cadres suivants ne sont utilisés, la présente feuille ne doit pas être incluse dans la requête.

Nom et adresse : (Nom de famille suivi du prénom; pour une personne morale, désignation officielle complète. L'adresse doit comprendre le code postal et le nom du pays. Le pays de l'adresse indiquée dans ce cadre est l'Etat où le déposant a son domicile si aucun domicile n'est indiqué ci-dessous.)

GABUS-DARLIX Caroline
Les Genêts 11
69630 CHAPONOST
FRANCE

Cette personne est :

 déposant seulement déposant et inventeur inventeur seulement
(Si cette case est cochée, ne pas remplir la suite.)Nationalité (nom de l'Etat) :
FR[ett]Domicile (nom de l'Etat) :
FR

Cette personne est déposant pour : tous les Etats désignés tous les Etats désignés sauf les Etats-Unis d'Amérique les Etats-Unis d'Amérique seulement les Etats indiqués dans le cadre supplémentaire

Nom et adresse : (Nom de famille suivi du prénom; pour une personne morale, désignation officielle complète. L'adresse doit comprendre le code postal et le nom du pays. Le pays de l'adresse indiquée dans ce cadre est l'Etat où le déposant a son domicile si aucun domicile n'est indiqué ci-dessous.)

DARLIX Jean-Luc
Les Genêts 11
69630 CHAPONOST
FRANCE

Cette personne est :

 déposant seulement déposant et inventeur inventeur seulement
(Si cette case est cochée, ne pas remplir la suite.)Nationalité (nom de l'Etat) :
FR[CH]Domicile (nom de l'Etat) :
FR

Cette personne est déposant pour : tous les Etats désignés tous les Etats désignés sauf les Etats-Unis d'Amérique les Etats-Unis d'Amérique seulement les Etats indiqués dans le cadre supplémentaire

Nom et adresse : (Nom de famille suivi du prénom; pour une personne morale, désignation officielle complète. L'adresse doit comprendre le code postal et le nom du pays. Le pays de l'adresse indiquée dans ce cadre est l'Etat où le déposant a son domicile si aucun domicile n'est indiqué ci-dessous.)

Cette personne est :

 déposant seulement déposant et inventeur inventeur seulement
(Si cette case est cochée, ne pas remplir la suite.)

Nationalité (nom de l'Etat) :

Domicile (nom de l'Etat) :

Cette personne est déposant pour : tous les Etats désignés tous les Etats désignés sauf les Etats-Unis d'Amérique les Etats-Unis d'Amérique seulement les Etats indiqués dans le cadre supplémentaire

Nom et adresse : (Nom de famille suivi du prénom; pour une personne morale, désignation officielle complète. L'adresse doit comprendre le code postal et le nom du pays. Le pays de l'adresse indiquée dans ce cadre est l'Etat où le déposant a son domicile si aucun domicile n'est indiqué ci-dessous.)

Cette personne est :

 déposant seulement déposant et inventeur inventeur seulement
(Si cette case est cochée, ne pas remplir la suite.)

Nationalité (nom de l'Etat) :

Domicile (nom de l'Etat) :

Cette personne est déposant pour : tous les Etats désignés tous les Etats désignés sauf les Etats-Unis d'Amérique les Etats-Unis d'Amérique seulement les Etats indiqués dans le cadre supplémentaire

D'autres déposants ou inventeurs sont indiqués sur une autre feuille annexe.

Cadre n° V DESIGNATION D'ETATS

Les désignations suivantes sont faites conformément à la règle 4.9.3) (cocher les cases appropriées: une au moins doit l'être) :

Brevet régional

AP Brevet ARIPO : GH Ghana, GM Gambie, KE Kenya, LS Lesotho, MW Malawi, SD Soudan, SZ Swaziland, UG Ouganda, ZW Zimbabwe et tout autre Etat qui est un Etat contractant du Protocole de Harare et du PCT

EA Brevet eurasien : AM Arménie, AZ Azerbaïdjan, BY Bélarus, KG Kirghizistan, KZ Kazakhstan, MD République de Moldova, RU Fédération de Russie, TJ Tadjikistan, TM Turkménistan et tout autre Etat qui est un Etat contractant de la Convention sur le brevet eurasien et du PCT

EP Brevet européen : AT Autriche, BE Belgique, CH et LI Suisse et Liechtenstein, DE Allemagne, DK Danemark, ES Espagne, FI Finlande, FR France, GB Royaume-Uni, GR Grèce, IE Irlande, IT Italie, LU Luxembourg, MC Monaco, NL Pays-Bas, PT Portugal, SE Suède et tout autre Etat qui est un Etat contractant de la Convention sur le brevet européen et du PCT, CY Chypre.

OA Brevet OAPI : BF Burkina Faso, BJ Bénin, CF République centrafricaine, CG Congo, CI Côte d'Ivoire, CM Cameroun, GA Gabon, GN Guinée, ML Mali, MR Mauritanie, NE Niger, SN Sénégal, TD Tchad, TG Togo et tout autre Etat qui est un Etat membre de l'OAPI et un Etat contractant du PCT (si une autre forme de protection ou de traitement est souhaitée, le préciser sur la ligne pointillée)

Brevet national (si une autre forme de protection ou de traitement est souhaitée, le préciser sur la ligne pointillée) :

<input type="checkbox"/> AL Albanie	<input type="checkbox"/> LT Lituanie
<input type="checkbox"/> AM Arménie	<input type="checkbox"/> LU Luxembourg
<input type="checkbox"/> AT Autriche	<input type="checkbox"/> LV Lettonie
<input checked="" type="checkbox"/> AU Australie	<input type="checkbox"/> MD République de Moldova
<input type="checkbox"/> AZ Azerbaïdjan	<input type="checkbox"/> MG Madagascar
<input type="checkbox"/> BA Bosnie-Herzégovine	<input type="checkbox"/> MK Ex-République yougoslave de Macédoine
<input type="checkbox"/> BB Barbade	<input type="checkbox"/> MN Mongolie
<input type="checkbox"/> BG Bulgarie	<input type="checkbox"/> MW Malawi
<input type="checkbox"/> BR Brésil	<input type="checkbox"/> MX Mexique
<input type="checkbox"/> BY Bélarus	<input type="checkbox"/> NO Norvège
<input checked="" type="checkbox"/> CA Canada	<input type="checkbox"/> NZ Nouvelle-Zélande
<input type="checkbox"/> CH et LI Suisse et Liechtenstein	<input type="checkbox"/> PL Pologne
<input type="checkbox"/> CN Chine	<input type="checkbox"/> PT Portugal
<input type="checkbox"/> CU Cuba	<input type="checkbox"/> RO Roumanie
<input type="checkbox"/> CZ République tchèque	<input type="checkbox"/> RU Fédération de Russie
<input type="checkbox"/> DE Allemagne	<input type="checkbox"/> SD Soudan
<input type="checkbox"/> DK Danemark	<input type="checkbox"/> SE Suède
<input type="checkbox"/> EE Estonie	<input type="checkbox"/> SG Singapour
<input type="checkbox"/> ES Espagne	<input type="checkbox"/> SI Slovénie
<input type="checkbox"/> FI Finlande	<input type="checkbox"/> SK Slovaquie
<input type="checkbox"/> GB Royaume-Uni	<input type="checkbox"/> SL Sierra Leone
<input type="checkbox"/> GE Géorgie	<input type="checkbox"/> TJ Tadjikistan
<input type="checkbox"/> GH Ghana	<input type="checkbox"/> TM Turkménistan
<input type="checkbox"/> GM Gambie	<input type="checkbox"/> TR Turquie
<input type="checkbox"/> GW Guinée-Bissau	<input type="checkbox"/> TT Trinité-et-Tobago
<input type="checkbox"/> HU Hongrie	<input type="checkbox"/> UA Ukraine
<input type="checkbox"/> ID Indonésie	<input type="checkbox"/> UG Ouganda
<input type="checkbox"/> IL Israël	<input checked="" type="checkbox"/> US Etats-Unis d'Amérique
<input checked="" type="checkbox"/> IS Islande	<input type="checkbox"/> UZ Ouzbékistan
<input type="checkbox"/> JP Japon	<input type="checkbox"/> VN Viet Nam
<input type="checkbox"/> KE Kenya	<input type="checkbox"/> YU Yougoslavie
<input type="checkbox"/> KG Kirghizistan	<input type="checkbox"/> ZW Zimbabwe
<input type="checkbox"/> KP République populaire démocratique de Corée	
<input type="checkbox"/> KR République de Corée	
<input type="checkbox"/> KZ Kazakhstan	
<input type="checkbox"/> LC Sainte-Lucie	
<input type="checkbox"/> LK Sri Lanka	
<input type="checkbox"/> LR Libéria	
<input type="checkbox"/> LS Lesotho	

Cases réservées pour la désignation (aux fins d'un brevet national) d'Etats qui sont devenus parties au PCT après la publication de la présente feuille :

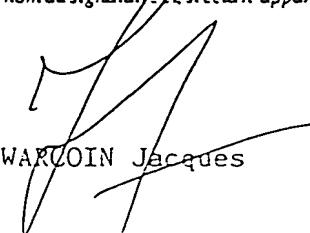
.....

.....

.....

Outre les désignations faites ci-dessus, le déposant fait aussi conformément à la règle 4.9.b) toutes les désignations qui seraient autorisées en vertu du PCT, sauf la désignation de

Le déposant déclare que ces désignations additionnelles sont faites sous réserve de confirmation et que toute désignation qui n'est pas confirmée avant l'expiration d'un délai de 15 mois à compter de la date de priorité doit être considérée comme retirée par le déposant à l'expiration de ce délai. (Pour confirmer une désignation, il faut déposer une déclaration contenant la désignation en question et joindre les taxes de désignation et de confirmation. La confirmation doit parvenir à l'office récepteur dans le délai de 15 mois.)

Cadre n° VI REVENDICATION DE PRIORITE			D'autres revendications de priorité sont indiquées dans le cadre supplémentaire <input type="checkbox"/>																										
La priorité de la ou des demandes antérieures suivantes est revendiquée :																													
Pays (dans lequel ou pour lequel la demande a été déposée)	Date de dépôt (jour/mois/année)	Demande n°	Office de dépôt (seulement s'il s'agit d'une demande régionale ou internationale)																										
(1) FRANCE	28 AVRIL 1997 (28/04/97)	97 05203																											
(2)																													
(3)																													
<p>Cocher la case ci-dessous si la copie certifiée conforme de la demande antérieure doit être délivrée par l'office qui, aux fins de la présente demande internationale, est l'office récepteur (une taxe peut être exigée) :</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> L'office récepteur est prié de préparer, et de transmettre au Bureau international, une copie certifiée conforme de la ou des demandes antérieures indiquées ci-dessus au(x) point(s) : VI</p>																													
Cadre n° VII ADMINISTRATION CHARGEÉE DE LA RECHERCHE INTERNATIONALE																													
<p>Choix de l'administration chargée de la recherche internationale (ISA)</p> <p>(Si plusieurs administrations chargées de la recherche internationale sont compétentes pour procéder à la recherche internationale, indiquer l'administration choisie; le code à deux lettres peut être utilisé) : ISA /</p> <p>Recherche antérieure Remplir si une recherche (internationale, de type international ou autre) a déjà été effectuée par l'administration chargée de la recherche internationale ou demandée à cette administration et si cette administration est maintenant priée de fonder la recherche internationale, dans la mesure du possible, sur les résultats de cette recherche antérieure. Pour permettre d'identifier cette recherche ou cette demande de recherche, donner les renseignements demandés ci-après pour la demande de brevet pertinente (ou sa traduction) ou pour la demande de recherche :</p>																													
Pays (ou office régional) : EP	Date (jour/mois/année) : 30 JANVIER 1998	Numéro :	FA 544307																										
Cadre n° VIII BORDEREAU																													
<p>La présente demande internationale comprend le nombre de feuilles suivant :</p> <table> <tr> <td>1. requête</td> <td>4</td> <td>feuilles</td> </tr> <tr> <td>2. description</td> <td>36</td> <td>feuilles</td> </tr> <tr> <td>3. revendications</td> <td>5</td> <td>feuilles</td> </tr> <tr> <td>4. abrégé</td> <td>1</td> <td>feuilles</td> </tr> <tr> <td>5. dessins</td> <td>5</td> <td>feuilles</td> </tr> <tr> <td>Total</td> <td>51</td> <td>feuilles</td> </tr> </table>		1. requête	4	feuilles	2. description	36	feuilles	3. revendications	5	feuilles	4. abrégé	1	feuilles	5. dessins	5	feuilles	Total	51	feuilles	<p>Le ou les éléments cochés ci-après sont joints à la présente demande internationale :</p> <table> <tr> <td>1. <input checked="" type="checkbox"/> pouvoir distinct signé A SUIVRE</td> <td>5. <input type="checkbox"/> feuille de calcul des taxes</td> </tr> <tr> <td>2. <input type="checkbox"/> copie du pouvoir général</td> <td>6. <input type="checkbox"/> indications séparées concernant des micro-organismes déposés</td> </tr> <tr> <td>3. <input type="checkbox"/> explication de l'absence d'une signature</td> <td>7. <input checked="" type="checkbox"/> listage de séquence de nucléotides ou d'acides aminés (disquette)</td> </tr> <tr> <td>4. <input checked="" type="checkbox"/> document(s) de priorité (indiqués dans le cadre n° VI au(x) point(s)):</td> <td>8. <input checked="" type="checkbox"/> autres éléments (préciser): Copie du Rapport de Recherche</td> </tr> </table>		1. <input checked="" type="checkbox"/> pouvoir distinct signé A SUIVRE	5. <input type="checkbox"/> feuille de calcul des taxes	2. <input type="checkbox"/> copie du pouvoir général	6. <input type="checkbox"/> indications séparées concernant des micro-organismes déposés	3. <input type="checkbox"/> explication de l'absence d'une signature	7. <input checked="" type="checkbox"/> listage de séquence de nucléotides ou d'acides aminés (disquette)	4. <input checked="" type="checkbox"/> document(s) de priorité (indiqués dans le cadre n° VI au(x) point(s)):	8. <input checked="" type="checkbox"/> autres éléments (préciser): Copie du Rapport de Recherche
1. requête	4	feuilles																											
2. description	36	feuilles																											
3. revendications	5	feuilles																											
4. abrégé	1	feuilles																											
5. dessins	5	feuilles																											
Total	51	feuilles																											
1. <input checked="" type="checkbox"/> pouvoir distinct signé A SUIVRE	5. <input type="checkbox"/> feuille de calcul des taxes																												
2. <input type="checkbox"/> copie du pouvoir général	6. <input type="checkbox"/> indications séparées concernant des micro-organismes déposés																												
3. <input type="checkbox"/> explication de l'absence d'une signature	7. <input checked="" type="checkbox"/> listage de séquence de nucléotides ou d'acides aminés (disquette)																												
4. <input checked="" type="checkbox"/> document(s) de priorité (indiqués dans le cadre n° VI au(x) point(s)):	8. <input checked="" type="checkbox"/> autres éléments (préciser): Copie du Rapport de Recherche																												
<p>La figure n° _____ des dessins (le cas échéant) est proposée pour publication avec l'abrégié.</p>																													
Cadre n° IX SIGNATURE DU DEPOSANT OU DU MANDATAIRE																													
<p>A côté de chaque signature, indiquer le nom du signataire si cela n'apparaît pas clairement à la lecture de la requête, à quel titre l'intéressé signe.</p> <p> WARCOIN Jacques</p> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; text-align: center;"> <p>CABINET REGIMBEAU CONSEILS EN PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE 26, Avenue Kléber 75116 PARIS FRANCE</p> </div>																													
Réservé à l'office récepteur																													
1. Date effective de réception des pièces supposées constituer la demande internationale :		2. Dessins : <input type="checkbox"/> reçus : <input type="checkbox"/> non reçus :																											
3. Date effective de réception, rectifiée en raison de la réception ultérieure, mais dans les délais, de documents ou de dessins complétant ce qui est supposé constituer la demande internationale :		<input type="checkbox"/>																											
4. Date de réception, dans les délais, des corrections demandées selon l'article 11.2) du PCT :		<input type="checkbox"/>																											
5. Administration chargée de la recherche internationale indiquée par le déposant : ISA /		6. <input type="checkbox"/> Transmission de la copie de recherche différée jusqu'au paiement de la taxe de recherche																											
Réservé au Bureau international																													
<p>Date de réception de l'exemplaire original par le Bureau international :</p>																													

TRAITE DE OPERATION EN MATIERE BREVETS

PCT

NOTIFICATION DE LA RECEPTION DE
L'EXEMPLAIRE ORIGINAL

(règle 24.2.a) du PCT)

Expéditeur: le BUREAU INTERNATIONAL

Destinataire:

MARTIN Jean-Jacques
Cabinet Regimbeau
26, Avenue Kléber
F-75116 Paris
FRANCE

ARRIVE L.
24. JUIN 1998CABINET
REGIMBEAU

Date d'expédition (jour/mois/année) 17 juin 1998 (17.06.98)	NOTIFICATION IMPORTANTE
Référence du dossier du déposant ou du mandataire 339057/16893	Demande internationale n° PCT/FR98/00849

Il est notifié au déposant que le Bureau international a reçu l'exemplaire original de la demande internationale précisée ci-après.

Noms du ou des déposants et de l'Etat ou des Etats pour lesquels ils sont déposants:

INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE (INSERM) (pour tous les Etats désignés sauf US)
LOPEZ LASTRA, Marcelo etc. (pour US seulement)

Date du dépôt international : 28 avril 1998 (28.04.98)
Date(s) de priorité revendiquée(s) : 28 avril 1997 (28.04.97)
Date de réception de l'exemplaire original par le Bureau international : 15 juin 1998 (15.06.98)

Liste des offices désignés :

EP :AT,BE,CH,CY,DE,DK,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE
National :AU,CA,JP,US

ATTENTION

Le déposant doit soigneusement vérifier les indications figurant dans la présente notification. En cas de divergence entre ces indications et celles que contient la demande internationale, il doit aviser immédiatement le Bureau international.

En outre l'attention du déposant est appelée sur les renseignements donnés dans l'annexe en ce qui concerne

- les délais dans lesquels doit être abordée la phase nationale
- la confirmation des désignations faites par mesure de précaution
- les exigences relatives aux documents de priorité.

Une copie de la présente notification est envoyée à l'office récepteur et à l'administration chargée de la recherche internationale.

Bureau international de l'OMPI 34, chemin des Colombettes 1211 Genève 20, Suisse no de télecopieur: (41-22) 740.14.35	Fonctionnaire autorisé Yolaine CUSSAC no de téléphone: (41-22) 338.83.38
--	--

RENSEIGNEMENTS CONCERNANT LES DELAIS DANS LESQUELS DOIT ETRE ABORDEE LA PHASE NATIONALE

Il est rappelé au déposant qu'il doit aborder la "phase nationale" auprès de chacun des offices désignés indiqués sur la notification de la réception de l'exemplaire original (formulaire PCT/IB/301) en payant les taxes nationales et en remettant les traductions, telles qu'elles sont prescrites par les législations nationales.

Le délai d'accomplissement de ces actes de procédure est de **20 MOIS** à compter de la date de priorité ou, pour les Etats désignés qui ont été élus par le déposant dans une demande d'examen préliminaire international ou dans une élection ultérieure, de **30 MOIS** à compter de la date de priorité, à condition que cette élection ait été effectuée avant l'expiration du 19e mois à compter de la date de priorité. Certains offices désignés (ou élus) ont fixé des délais qui expirent au-delà de 20 ou 30 mois à compter de la date de priorité. D'autres offices accordent une prolongation des délais ou un délai de grâce, dans certains cas moyennant le paiement d'une taxe supplémentaire.

En plus de ces actes de procédure, le déposant devra dans certains cas satisfaire à d'autres exigences particulières applicables dans certains offices. Il appartient au déposant de veiller à remplir en temps voulu les conditions requises pour l'ouverture de la phase nationale. La majorité des offices désignés n'envoient pas de rappel à l'approche de la date limite pour aborder la phase nationale.

Des informations détaillées concernant les actes de procédure à accomplir pour aborder la phase nationale auprès de chaque office désigné, les délais applicables et la possibilité d'obtenir une prolongation des délais ou un délai de grâce et toutes autres conditions applicables figurent dans le volume II du Guide du déposant du PCT. Les exigences concernant le dépôt d'une demande d'examen préliminaire international sont exposées dans le chapitre IX du volume I du Guide du déposant du PCT.

GR et ES sont devenues liées par le chapitre II du PCT le 7 septembre 1996 et le 6 septembre 1997, respectivement, et peuvent donc être élues dans une demande d'examen préliminaire international ou dans une élection ultérieure présentée le 7 septembre 1996 (ou à une date postérieure) ou le 6 septembre 1997 (ou à une date postérieure), respectivement, quelle que soit la date de dépôt de la demande internationale (voir le second paragraphe, ci-dessus).

Veuillez noter que seul un déposant qui est ressortissant d'un Etat contractant du PCT lié par le chapitre II ou qui y a son domicile peut présenter une demande d'examen préliminaire international.

CONFIRMATION DES DESIGNATIONS FAITES PAR MESURE DE PRECAUTION

Seules les désignations expresses faites dans la requête conformément à la règle 4.9.a) figurent dans la présente notification. Il est important de vérifier si ces désignations ont été faites correctement. Des erreurs dans les désignations peuvent être corrigées lorsque des désignations ont été faites par mesure de précaution en vertu de la règle 4.9.b). Toute désignation ainsi faite peut être confirmée conformément aux dispositions de la règle 4.9.c) avant l'expiration d'un délai de 15 mois à compter de la date de priorité. En l'absence de confirmation, une désignation faite par mesure de précaution sera considérée comme retirée par le déposant. Il ne sera adressé aucun rappel ni invitation. Pour confirmer une désignation, il faut déposer une déclaration précisant l'Etat désigné concerné (avec l'indication de la forme de protection ou de traitement souhaitée) et payer les taxes de désignation et de confirmation. La confirmation doit parvenir à l'office récepteur dans le délai de 15 mois.

EXIGENCES RELATIVES AUX DOCUMENTS DE PRIORITE

Pour les déposants qui n'ont pas encore satisfait aux exigences relatives aux documents de priorité, il est rappelé ce qui suit.

Lorsque la priorité d'une demande nationale antérieure est revendiquée ("nationale" signifiant nationale ou régionale), le déposant doit présenter une copie de cette demande nationale, certifiée conforme par l'administration auprès de laquelle elle a été déposée ("document de priorité"), à l'office récepteur (qui la transmettra au Bureau international) ou directement au Bureau international, avant l'expiration d'un délai de 16 mois à compter de la date de priorité (règle 17.1).

Si le document de priorité est délivré par l'office récepteur, le déposant peut, au lieu de présenter ce document, demander à l'office récepteur de le préparer et de le transmettre au Bureau international. La requête à cet effet doit être formulée avant l'expiration du délai de 16 mois.

Il est rappelé que, lorsque plusieurs priorités sont revendiquées, la date de priorité à prendre en considération aux fins du calcul du délai de 16 mois est la date du dépôt de la demande la plus ancienne dont la priorité est revendiquée.

Si le document de priorité en question n'est pas fourni au Bureau international avant l'expiration du délai de 16 mois, ou si la demande adressée à l'office récepteur de transmettre le document de priorité n'a pas été faite (et la taxe correspondante acquittée, le cas échéant) avant l'expiration de ce délai, tout Etat désigné peut ne pas tenir compte de la revendication de priorité.

TRAITE DE L'OPERATION EN MATIERE DE BREVETS

PCT

NOTIFICATION RELATIVE A LA PRESENTATION
DU DOCUMENT DE PRIORITE

(instruction administrative 411 du PCT)

Expéditeur : le BUREAU INTERNATIONAL

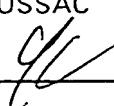
Destinataire:

MARTIN Jean-Jacques
Cabinet Regimbeau
26, Avenue Kléber
F-75116 Paris
FRANCE

Date d'expédition (jour/mois/année) 17 juin 1998 (17.06.98)			
Référence du dossier du déposant ou du mandataire 339057/16893		NOTIFICATION IMPORTANTE	
Demande internationale no PCT/FR98/00849	Date du dépôt international 28 avril 1998 (28.04.98)	Date de priorité 28 avril 1997 (28.04.97)	
Déposant INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE (INSERM) etc			

La date de réception par le Bureau international du ou des documents de priorité correspondant à la ou aux demandes suivantes est notifiée au déposant:

<u>Demande antérieure no:</u>	<u>Date de priorité:</u>	<u>Pays dans lequel ou pour lequel la demande a été déposée:</u>	<u>Date de réception du document de priorité</u>
97/05203	28 avr 1997 (28.04.97)	FR	15 jui 1998 (15.06.98)

Bureau international de l'OMPI 34, chemin des Colombettes 1211 Genève 20, Suisse no de télécopieur: (41-22) 740.14.35	Fonctionnaire autorisé: Yolaine CUSSAC no de téléphone: (41-22) 338.83.38 
--	--

TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE BREVETS

28 Rec'd PCT/PTO 28 DEC 1998
PCT

AVIS INFORMANT LE DEPOSANT DE LA
COMMUNICATION DE LA DEMANDE
INTERNATIONALE AUX OFFICES DESIGNES

(règle 47.1.c), première phrase, du PCT)

Date d'expédition (jour/mois/année)

05 novembre 1998 (05.11.98)

Expéditeur: le BUREAU INTERNATIONAL

Destinataire:

MARTIN Jean-Jacques
Cabinet Regimbeau
26, avenue Kléber
F-75116 Paris
FRANCE

ARRIVE LE
16 NOV. 1998
CABINET
REGIMBEAU

Référence du dossier du déposant ou du mandataire

339057/16893

AVIS IMPORTANT

Demande internationale no

PCT/FR98/00849

Date du dépôt international (jour/mois/année)

28 avril 1998 (28.04.98)

Date de priorité (jour/mois/année)

28 avril 1997 (28.04.97)

Déposant

INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE
(INSERM) etc

1. Il est notifié par la présente qu'à la date indiquée ci-dessus comme date d'expédition de cet avis, le Bureau international a communiqué, comme le prévoit l'article 20, la demande internationale aux offices désignés suivants:

AU,CA,EP,JP,US

Conformément à la règle 47.1.c), troisième phrase, ces offices acceptent le présent avis comme preuve déterminante du fait que la communication de la demande internationale a bien eu lieu à la date d'expédition indiquée plus haut, et le déposant n'est pas tenu de remettre de copie de la demande internationale à l'office ou aux offices désignés.

2. Les offices désignés suivants ont renoncé à l'exigence selon laquelle cette communication doit être effectuée à cette date:
Aucun

La communication sera effectuée seulement sur demande de ces offices. De plus, le déposant n'est pas tenu de remettre de copie de la demande internationale aux offices en question (règle 49.1)a-bis)).

3. Le présent avis est accompagné d'une copie de la demande internationale publiée par le Bureau international le 05 novembre 1998 (05.11.98) sous le numéro WO 98/49334

RAPPEL CONCERNANT LE CHAPITRE II (article 31.2)a) et règle 54.2)

Si le déposant souhaite reporter l'ouverture de la phase nationale jusqu'à 30 mois (ou plus pour ce qui concerne certains offices) à compter de la date de priorité, la demande d'examen préliminaire international doit être présentée à l'administration compétente chargée de l'examen préliminaire international avant l'expiration d'un délai de 19 mois à compter de la date de priorité.

Il appartient exclusivement au déposant de veiller au respect du délai de 19 mois.

Il est à noter que seul un déposant qui est ressortissant d'un Etat contractant du PCT lié par le chapitre II ou qui y a son domicile peut présenter une demande d'examen préliminaire international.

RAPPEL CONCERNANT L'OUVERTURE DE LA PHASE NATIONALE (article 22 ou 39.1))

Si le déposant souhaite que la demande internationale procède en phase nationale, il doit, dans le délai de 20 mois ou de 30 mois, ou plus pour ce qui concerne certains offices, accomplir les actes mentionnés dans ces dispositions auprès de chaque office désigné ou élu.

Pour d'autres informations importantes concernant les délais et les actes à accomplir pour l'ouverture de la phase nationale, voir l'annexe du formulaire PCT/IB/301 (Notification de la réception de l'exemplaire original) et le volume II du Guide du déposant du PCT.

Fonctionnaire autorisé

J. Zahra

no de télécopieur (41-22) 740.14.35

no de téléphone (41-22) 338.83.38

Suite du formulaire PCT/IB/308

**AVIS INFORMANT LE DEPOSANT DE LA COMMUNICATION DE
LA DEMANDE INTERNATIONALE AUX OFFICES DESIGNÉS**

Date d'expédition (jour/mois/année) 05 novembre 1998 (05.11.98)	AVIS IMPORTANT
Référence du dossier du déposant ou du mandataire 339057/16893	Demande internationale no PCT/FR98/00849
<p>Il est notifié au déposant que, au moment de l'établissement du présent avis, le délai fixé à la règle 46.1 pour le dépôt de modifications selon l'article 19 n'était pas encore expiré et que le Bureau international n'avait pas reçu de modifications ni de déclaration l'informant que le déposant ne souhaitait pas présenter de modifications.</p>	



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁶ : C12N 15/86, 15/11 // 15/67		A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 98/49334 (43) Date de publication internationale: 5 novembre 1998 (05.11.98)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR98/00849 (22) Date de dépôt international: 28 avril 1998 (28.04.98)		(81) Etats désignés: AU, CA, JP, US, brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).	
(30) Données relatives à la priorité: 97/05203 28 avril 1997 (28.04.97) FR		Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale. Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si des modifications sont reçues.</i>	
(71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE (INSERM) [FR/FR]; 101, rue de Tolbiac, F-75013 Paris (FR).			
(72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement): LOPEZ LASTRA, Marcello [CL/FR]; 34, rue de Bourg, F-69007 Lyon (FR). GABUS-DARLIX, Caroline [FR/FR]; 11, les Genêts, F-69630 Chaponost (FR). DARLIX, Jean-Luc [FR/FR]; 11, les Genêts, F-69630 Chaponost (FR).			
(74) Mandataires: MARTIN Jean-Jacques etc.; Cabinet Regimbeau, 26, avenue Kléber, F-75116 Paris (FR).			

(54) Title: NOVEL INTERNAL RIBOSOME ENTRY SITE AND VECTOR CONTAINING SAME

(54) Titre: NOUVEAU SITE INTERNE D'ENTREE DES RIBOSOMES ET VECTEUR LE CONTENANT

(57) Abstract

The invention concerns the use of a nucleotide sequence derived from all or part of the genomic RNA 5' end of a type C retrovirus except for Friend murine leukaemia virus (FMLV) and Moloney murine leukaemia virus (MoMLV) as internal ribosome entry site or as element enabling or improving retrovirus vector packaging. The invention also concerns a vector comprising said nucleotide sequence, a viral particle generated from this vector, a cell comprising this vector or infected by the viral particle, their therapeutic use and a pharmaceutical composition containing them. The invention further concerns the use of a vector, a viral particle or a pharmaceutical composition for transfecting or infecting pluripotent stem cells.

(57) Abrégé

La présente invention concerne l'utilisation d'une séquence nucléotidique dérivée de tout ou partie de l'extrémité 5' de l'ARN génomique d'un rétrovirus de type C à l'exception des virus de la leucémie murine de Friend (FMLV) et de Moloney (MoMLV) à titre de site interne d'entrée des ribosomes ou d'élément permettant ou améliorant l'encapsidation de vecteurs rétroviraux. Elle a également pour objet un vecteur comprenant ladite séquence nucléotidique, une particule virale générée à partir de ce vecteur, une cellule comprenant ce vecteur ou infectée par la particule virale, leur utilisation thérapeutique ainsi qu'une composition pharmaceutique les comprenant. Enfin, elle a trait à l'utilisation d'un vecteur, d'une particule virale ou d'une composition pharmaceutique pour la transfection ou l'infection de cellules pluripotentes.

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AI.	Albanie	ES	Espagne	LS	Lesotho	SI	Slovénie
AM	Arménie	FI	Finlande	LT	Lituanie	SK	Slovaquie
AT	Autriche	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
AU	Australie	GA	Gabon	LV	Lettonie	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaïdjan	GB	Royaume-Uni	MC	Monaco	TD	Tchad
BA	Bosnie-Herzégovine	GE	Géorgie	MD	République de Moldova	TG	Togo
BB	Barbade	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tadjikistan
BE	Belgique	GN	Guinée	MK	Ex-République yougoslave de Macédoine	TM	Turkménistan
BF	Burkina Faso	GR	Grèce	ML	Mali	TR	Turquie
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	MN	Mongolie	TT	Trinité-et-Tobago
BJ	Bénin	IE	Irlande	MR	Mauritanie	UA	Ukraine
BR	Brésil	IL	Israël	MW	Malawi	UG	Ouganda
BY	Bélarus	IS	Islande	MX	Mexique	US	Etats-Unis d'Amérique
CA	Canada	IT	Italie	NE	Niger	UZ	Ouzbékistan
CF	République centrafricaine	JP	Japon	NL	Pays-Bas	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NO	Norvège	YU	Yougoslavie
CH	Suisse	KG	Kirghizistan	NZ	Nouvelle-Zélande	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	République populaire démocratique de Corée	PL	Pologne		
CM	Cameroon	KR	République de Corée	PT	Portugal		
CN	Chine	KZ	Kazakhstan	RO	Roumanie		
CU	Cuba	LC	Sainte-Lucie	RU	Fédération de Russie		
CZ	République tchèque	LI	Liechtenstein	SD	Soudan		
DE	Allemagne	LK	Sri Lanka	SE	Suède		
DK	Danemark	LR	Libéria	SG	Singapour		
EE	Estonie						

Nouveau site interne d'entrée des ribosomes et vecteur le contenant

5 La présente invention concerne l'utilisation d'une séquence nucléotidique dérivée de l'extrémité 5' de l'ARN génomique ou de l'ADN proviral d'un virus de la réticuloendothéliose à titre de site interne d'entrée des ribosomes (IRES) et/ou pour améliorer l'encapsidation rétrovirale. Plus particulièrement, elle concerne des vecteurs d'expression comportant cette séquence et notamment des
10 vecteurs polycistroniques permettant l'expression efficace et stable de plusieurs gènes d'intérêt sous la dépendance d'un même promoteur. La présente invention trouve une application intéressante dans le domaine des vecteurs de thérapie génique.

La faisabilité de la thérapie génique appliquée à l'homme n'est plus à
15 démontrer et ceci concerne de nombreuses applications thérapeutiques comme les maladies génétiques, les maladies infectieuses et les cancers. De nombreux documents de l'art antérieur décrivent les moyens de mettre en oeuvre une thérapie génique, notamment par l'intermédiaire de vecteurs viraux. D'une manière générale, les vecteurs sont obtenus par délétion d'au moins une partie
20 des gènes viraux qui sont remplacés par les gènes d'intérêt thérapeutique. De tels vecteurs peuvent être propagés dans une lignée de complémentation qui fournit *en trans* les fonctions virales délétées pour générer une particule virale défective pour la réPLICATION mais capable d'infecter une cellule hôte. A ce jour, les vecteurs rétroviraux sont parmi les plus utilisés mais on peut citer également
25 des vecteurs issus des adénovirus, virus associés aux adénovirus, poxvirus et virus de l'herpès. Ce type de vecteurs, leur organisation et leur mode d'infection sont largement décrits dans la littérature accessible à l'homme de l'art.

A titre indicatif, le génome rétroviral est constitué par un ARN linéaire, simple brin et de polarité positive. Outre les séquences de régulation R et US et

U3 et R présentes aux extrémité 5' et 3' respectivement, il porte trois gènes : *gag* codant pour les protéines de la capsid, *pol* codant pour la transcriptase inverse et l'intégrase et *env* codant pour les protéines de l'enveloppe. Les signaux d'encapsidation, situés en aval des séquences U5 jusqu'au début de la 5 région codante du gène *gag*, participent à la dimérisation et l'encapsidation de l'ARN viral dans les particules virales. L'extrémité 5' du génome comprend une coiffe (cap) et l'extrémité 3' est polyadénylée. Lors du cycle infectieux, l'ARN viral est converti en un ADN proviral linéaire, double brin muni à chaque extrémité de séquences répétées inversées LTRs (pour Long Terminal Repeat en 10 anglais) nécessaires à l'initiation de la transcription. Celle-ci, réalisée par la machinerie cellulaire, permet la production des ARN génomiques et subgénomiques à partir desquels sont synthétisées les protéines virales. Les rétrovirus peuvent être classés en 4 sous-familles A à D, sur la base de leur morphologie. Le type C regroupe la majorité des rétrovirus dont les virus MLV 15 (Murine Leukemia Virus) et MSV (Murine Sarcoma Virus) utilisés dans la plupart des vecteurs de thérapie génique et les virus REV (Reticuloendotheliosis Virus) d'où dérive la séquence nucléotidique de la présente invention.

Il peut être avantageux de disposer de vecteurs de thérapie génique plus performants et capables notamment de produire efficacement plusieurs protéines 20 d'intérêt. Cependant, la présence de plusieurs promoteurs au sein du même vecteur se traduit très souvent par une réduction voire même une perte de l'expression au cours du temps. Ceci est dû à un phénomène bien connu 25 d'interférence entre les séquences promotrices. Dans ce contexte, la publication de la demande internationale WO93/03143 propose une solution à ce problème qui consiste à mettre en oeuvre un site interne d'entrée des ribosomes (IRES). Elle décrit un vecteur rétroviral dicistonique pour l'expression de deux gènes d'intérêt placés sous le contrôle du même promoteur. La présence d'un site IRES de picornavirus entre ceux-ci permet la production du produit d'expression issu du second gène d'intérêt par initiation interne de la traduction de l'ARNm

dicistronique.

Normalement, l'entrée des ribosomes au niveau de l'ARN messager (ARNm) se fait par la coiffe située à l'extrême 5' de l'ensemble des ARNm eucaryotes. Les sous unités ribosomales 40S se déplacent le long de l'ARN 5 jusqu'à rencontrer un codon AUG approprié pour débuter la synthèse protéique. Généralement, l'initiation a lieu au niveau du premier codon AUG. Mais, si celui-ci est dans un contexte peu favorable, les sous unités 40S poursuivent jusqu'à un codon AUG ultérieur situé dans un meilleur contexte traductionnel (Kozak, 1984, *Nucleic Acid Res.* 12, 3873-3893 ; Kozak, 1991, *J. Biol. Chem.* 10 266, 19867-19870 ; Pain, 1996, *Eur. J. Biochem.* 236, 747-771).

Cependant, cette règle universelle connaît des exceptions. L'absence de coiffe chez certains ARNm viraux laissait supposer l'existence de structures alternatives permettant l'entrée des ribosomes à un site interne de ces ARN. A ce jour, un certain nombre de ces structures, nommées IRES du fait de leur 15 fonction, ont été identifiées dans la région 5' non codante des ARNm viraux non coiffés comme celle notamment des picornavirus tel que le virus de la poliomyélite (Pelletier et al., 1988, *Mol. Cell. Biol.* 8, 1103-1112) et l'EMCV (Encephalomyocarditis virus (Jang et al., 1988, *J. Virol.* 62, 2636-2643). Des ARNm cellulaires possédant des éléments IRES ont également été décrits. On 20 peut citer ceux codant pour la protéine BIP (pour Immunoglobulin heavy chain binding protein ; Macejak et Sarnow, 1991, *Nature* 353, 90-94), certains facteurs de croissance (Teerink et al., 1995, *Biochem. Biophys. Acta* 1264, 403-408 ; Vagner et al., 1995, *Mol. Cell. Biol.* 15, 35-44), le facteur d'initiation de la traduction eIF4G (Gan et Rhoads, 1996, *J. Biol. Chem.* 271, 623-626) et deux 25 facteurs de transcription de levure TFIID et HAP4 (Iizuka et al., 1994, *Mol. Cell. Biol.*, 14, 7322-7330). Des sites IRES ont également mis en évidence dans les retrotransposons murins de type VL30 (Berlioz et al., 1995, *J. Virol.* 69, 6400-6407) et, plus récemment dans les ARNm codant pour le précurseur gag des virus de la leucémie murine de Friend (FMLV) et de Moloney (MoMLV)

- 4 -

(Berlioz et Darlix, 1995, J. Virol. 69, 2214-2222 ; Vagner et al., 1995, J. Biol. Chem. 270, 20376-20383).

On a maintenant trouvé un nouveau site interne d'entrée des ribosomes dans la région 5' non codante de l'ARN du virus aviaire de la 5 réticuloendothéliose (REV) de type A (REV-A) et montré son efficacité pour initier la traduction de séquences codantes placées à sa suite d'une manière monocistronique ou dicistonique.

Le site IRES de la présente invention est particulièrement avantageux par rapport à ceux déjà décrits dans la littérature. En premier lieu, il permet un taux 10 d'expression important du cistron qu'il contrôle. En outre et, de manière inattendue, il peut également, dans le cadre d'un vecteur rétroviral, contribuer ou améliorer, en association avec une région d'encapsidation appropriée, les fonctions de dimérisation ou d'encapsidation, permettant une augmentation du titre viral. Et enfin, du fait de sa faible homologie avec les séquences rétrovirales 15 murines utilisées dans la plupart des vecteurs de thérapie génique destinés à un usage humain, son emploi réduit considérablement le risque de production de virus compétents pour la réPLICATION.

La plupart des protocoles de thérapie génique approuvés par le RAC (Recombinant DNA Advisory Committee) aux Etats Unis utilisent des vecteurs 20 dérivés du virus MoMLV. A l'heure actuelle, le choix d'un vecteur rétroviral spécifique pour une application thérapeutique donnée reste empirique et les facteurs influençant le titre viral et l'expression des gènes n'ont pas encore été clairement élucidés. L'étude des séquences agissant *en cis* qui contrôlent l'encapsidation et l'établissement des forces relatives de divers éléments IRES 25 peuvent permettre d'optimiser les vecteurs de thérapie génique en termes de titre et d'expression génique. Un des buts de la présente invention est de proposer de nouveaux vecteurs rétroviraux susceptibles d'être propagés à haut titre et de permettre une expression optimale d'un ou plusieurs gènes d'intérêt.

C'est pourquoi la présente invention a pour objet l'utilisation d'une

- 5 -

séquence nucléotidique dérivée de tout ou partie de l'extrémité 5' de l'ARN génomique d'un rétrovirus de type C à l'exception des virus de la leucémie murine de Friend (FMLV) et de Moloney (MoMLV), à titre de site interne d'entrée des ribosomes (IRES) dans un vecteur et/ou pour permettre ou améliorer 5 l'encapsidation d'un vecteur rétroviral.

Par séquence nucléotidique, on entend une séquence composée de ribo (ARN) ou de désoxyribonucléotides (ADN). Dans le cadre de la présente invention, l'extrémité 5' de l'ARN génomique d'un rétrovirus correspond au quart 5' dudit ARN qui s'étend du site d'initiation de la transcription (nucléotide +1) 10 jusqu'à environ 2 kb dans la direction 3'. Le terme rétrovirus est largement défini dans les ouvrages de base de virologie accessibles à l'homme de l'art et les caractéristiques essentielles ont été résumées à titre indicatif ci-dessus. Le terme "dérivée" fait référence à une séquence ayant une origine rétrovirale de type C, mais qui peut avoir subi au moins une modification par rapport à la séquence 15 native. La ou les modifications envisageables incluent la délétion, l'addition, la substitution et/ou la mutation d'un ou plusieurs nucléotides (nt). De telles modifications peuvent avoir pour but par exemple d'accroître les fonctions IRES, d'encapsidation ou d'introduire des sites de restriction adéquates pour faciliter les étapes de clonage ultérieures. Le terme "dérivée" comprend également 20 l'équivalent ADN de l'ARN génomique sous une forme modifiée ou non.

Par IRES, on désigne un site capable de promouvoir l'entrée des ribosomes dans une molécule d'ARN d'une manière indépendante de la coiffe. Conformément aux buts poursuivis par la présente invention, la fonction IRES peut s'exercer dans tout vecteur ou cassette d'expression. Une séquence en usage 25 dans le cadre de la présente invention peut également agir en tant qu'élément activateur de l'encapsidation des rétrovirus ou vecteurs rétroviraux en favorisant la dimérisation de deux copies du génome rétroviral et/ou l'encapsidation du dimère dans les particules virales. Selon un mode de réalisation préféré, ladite séquence est capable d'exercer une fonction IRES et d'améliorer la fonction

d'encapsidation lorsqu'elle est introduite dans un vecteur rétroviral approprié.

Une séquence nucléotidique telle qu'utilisée dans le cadre de la présente invention, peut être isolée de l'extrémité 5' de l'ARN génomique ou de l'ADN proviral d'un rétrovirus de type C ou de tout plasmide de l'état de la technique 5 portant le fragment rétroviral d'intérêt. Il va sans dire qu'elle peut être générée par toute technique en usage dans le domaine de l'art, par exemple par clonage à l'aide de sondes appropriées, par PCR (Polymerase Chain reaction) ou encore par synthèse chimique. Avantageusement, ladite séquence comprend tout ou partie de la région qui suit le domaine U3 du LTR 5', jusqu'au codon AUG initiateur du 10 gène *gag*. Aux fins de la présente invention, elle comprend au moins 50 nucléotides, avantageusement au moins 100 nucléotides, de préférence au moins 200 nucléotides et de manière préférée au moins 300 nucléotides compris dans ladite extrémité 5'. Mais, bien entendu, elle peut s'étendre au delà dans la direction 5' ou 3' ou comporter des séquences supplémentaires. Avantageusement, ladite 15 séquence comprend de 100 à 1500 nucléotides et, en particulier, de 300 à 800 nucléotides.

On préfère mettre en oeuvre dans le cadre de la présente invention un rétrovirus de type C à l'exception des virus FMLV et MoMLV. Un rétrovirus de type C convenant plus particulièrement, est sélectionné parmi les virus REV 20 (Virus de la réticuloendothéliose), MSV (Murine sarcoma virus) et notamment celui de Moloney (MMSV), MHV (*Mus hortulanus* virus), MEV (Mouse endogenous retrovirus), FMOV (FBR murine osteosarcoma virus), AMLV (AKV murine leukemia virus), MEELV (Mouse endogenous ecotropic murine leukemia virus), SFFV (Friend spleen focus-forming virus), RASV (rat sarcoma virus), FLV 25 (Feline leukemia virus), FSV (feline sarcoma virus), EFLV (Cat endogenous proviral feline leukemia virus), SSV (Simian sarcoma virus), GALV (Gibbon ape leukemia virus) et BAEV (Baboon endogenous virus).

Selon un mode de réalisation tout à fait préféré, une séquence nucléotidique en usage dans la présente invention dérive de tout ou partie de

l'extrémité 5' de l'ARN génomique d'un virus de la réticuloendothéliose (REV). Les virus REV comprennent notamment différents sous-types A, B et T ainsi que les virus DIAV (Duck infectious anemia virus), SNV (spleen necrosis virus) et CSV (Chick syncytial virus) (voir par exemple Encyclopedia of Virology, 1994, 5 Enrietto, Reticuloendotheliosis viruses, p1227-1232 Ed. R. Webster et A. Granoff, Academic Press, Hartourt Brace § Company Publishers). Un virus REV convenant tout particulièrement est le virus de la réticuloendothéliose aviaire, notamment celui de type A (REV-A).

Selon cette dernière variante, on aura de préférence recours à une séquence 10 nucléotidique comprenant au moins 100 nucléotides et au plus 800 nucléotides (nt) de l'extrémité 5' non codante du virus REV-A et plus particulièrement une séquence nucléotidique实质上 homologue ou identique à tout ou partie de la séquence présentée dans l'identificateur de séquence SEQ ID NO: 1. A titre 15 d'exemples préférés, on peut citer une séquence nucléotidique实质上 homologue ou identique à la séquence présentée dans l'identificateur de séquence SEQ ID NO: 2 :

- (i) commençant au nucléotide 1 et se terminant au nucléotide 578,
- (ii) commençant au nucléotide 265 et se terminant au nucléotide 578,
ou
- 20 (iii) commençant au nucléotide 452 et se terminant au nucléotide 578.

Le terme实质上 homologue fait référence à un degré d'homologie supérieur à 70%, avantageusement supérieur à 80%, de préférence supérieur à 90% et, de manière tout à fait préférée, supérieur à 95%. Comme déjà indiqué, ladite séquence nucléotidique peut avoir une séquence légèrement différente de celle décrite dans la SEQ ID NO: 1 ou 2, à la condition toutefois que la ou les modifications n'affecte(nt) pas ses fonctions IRES et/ou d'encapsidation. 25

Selon un mode avantageux, la séquence nucléotidique utilisée dans le cadre de la présente invention est identique à la séquence présentée dans l'identificateur de séquence SEQ ID NO: 2 :

- (i) commençant au nucléotide 1 et se terminant au nucléotide 578,
- (ii) commençant au nucléotide 265 et se terminant au nucléotide 578,
ou
- (iii) commençant au nucléotide 452 et se terminant au nucléotide 578.

5 La fonction IRES de ladite séquence nucléotidique est particulièrement avantageuse dans un contexte pauvre en ion magnésium, par exemple dans un contexte cellulaire. Un concentration élevée en ions Mg^{2+} peut diminuer l'efficacité de l'initiation de la traduction médiée par la séquence.

Une séquence nucléotidique en usage dans la présente invention, est plus 10 particulièrement destinée à être intégrée dans un vecteur de transfert et d'expression d'un ou plusieurs gène(s) d'intérêt. Le choix d'un tel vecteur est large et les techniques de clonage dans le vecteur retenu sont à la portée de l'homme de l'art. Conformément aux buts poursuivis par la présente invention, on peut envisager un vecteur plasmidique ou un vecteur dérivé d'un virus animal et, en 15 particulier, d'un poxvirus (canari pox ou virus de la vaccine, notamment Copenhage ou MVA), adénovirus, baculovirus, virus de l'herpès, virus associé à un adénovirus ou rétrovirus. De tels vecteurs sont largement décrits dans la littérature. En particulier, lorsqu'il s'agit d'un vecteur adénoviral, celui-ci peut être issu d'un adénovirus humain (de préférence de type 2 ou 5), animal (de préférence 20 canin ou bovin) ou encore d'un hybride entre des espèces variées. La technologie générale concernant les adénovirus est divulguée dans Graham et Prevec (1991, Methods in Molecular Biology, Vol 7, Gene transfer and Expression Protocols ; Ed E.J. Murray, the Human Press Inc, p 109-118).

Conformément aux buts poursuivis dans le cadre de la présente invention, 25 ladite séquence nucléotidique est de préférence positionnée en amont d'un gène d'intérêt pour améliorer la traduction du produit d'expression pour lequel celui-ci code. Elle peut être mise en oeuvre dans une cassette d'expression de type monocistronique (pour l'expression d'un gène d'intérêt placé sous le contrôle d'un promoteur) ou polycistronique (pour l'expression d'au moins deux gènes d'intérêt

5 placés sous le contrôle d'un même promoteur). Cette dernière peut contenir plusieurs éléments en tandem "site IRES-gène d'intérêt" dont au moins un des sites IRES est constitué par une séquence nucléotidique telle que définie auparavant. On préfère tout particulièrement l'utilisation dans une cassette dicistronique soit en amont du premier gène d'intérêt soit en amont du second, cette dernière variante étant la préférée.

10 Lorsqu'un vecteur selon l'invention comprend plusieurs cassettes d'expression, celles-ci peuvent être insérées dans une orientation quelconque les unes par rapport aux autres, soit dans une même orientation (promoteur agissant dans une même direction) ou en orientation réverse (promoteur agissant dans une orientation opposée). Par ailleurs, un vecteur selon l'invention peut comprendre plusieurs séquences nucléotidiques en usage selon l'invention. Dans ce cas, il est préférable qu'elles dérivent de rétrovirus de type C différents.

15 Selon un mode de réalisation tout à fait préféré, un vecteur selon l'invention dérive d'un rétrovirus. On peut citer à titre d'exemples, les rétrovirus aviaires tels que le virus de l'érythroblastose aviaire (AEV), le virus de la leucémie aviaire (AVL), le virus du sarcome aviaire (ASV), le virus de la nécrose de la rate (SNV) et le virus du sarcome de Rous (RSV), les rétrovirus bovins, les rétrovirus félin (FLV, FSV....), les rétrovirus murins tels que le virus de la leucémie murine (MuLV), le virus de Friend (FMLV) et le virus du sarcome murin (MSV) et les rétrovirus de primate (GALV, FSV, BAEV...). Bien entendu, d'autres rétrovirus peuvent être mis en oeuvre. Cependant, on préfère tout particulièrement avoir recours au virus MoMLV. Les nombreux vecteurs rétroviraux décrits dans la littérature peuvent être utilisés dans le cadre de la présente invention.

20 25 Les vecteurs rétroviraux envisageables aux fins de la présente invention comprennent au moins les éléments suivants associés d'une manière fonctionnelle : un LTR 5' et un LTR 3' rétroviraux, un ou plusieurs gène(s) d'intérêt, et la séquence nucléotidique en usage dans le cadre de la présente invention pour permettre ou améliorer l'encapsidation dudit vecteur dans une particule virale

- 10 -

et/ou à titre de site IRES pour permettre ou favoriser l'expression d'un gène d'intérêt positionné en aval de ladite séquence nucléotidique. Il va sans dire que le LTR 5' rétroviral peut être utilisé comme promoteur mais on peut également avoir recours à un promoteur interne. Par ailleurs, le LTR 5' et éventuellement 3' 5 peuvent avoir la même origine rétrovirale (par exemple REV) que la séquence nucléotidique ou une origine différente. Par exemple, un vecteur monocistronique comprendra de 5' vers 3' un LTR 5', la séquence nucléotidique, un gène d'intérêt et un LTR 3'.

10 Bien entendu, un vecteur rétroviral selon l'invention peut également comprendre une région d'encapsidation (E+) conventionnelle. Cependant, la présence de cette dernière n'est pas exigée lorsque la séquence nucléotidique en usage dans la présente invention peut exercer à elle-seule la fonction d'encapsidation. Un tel mode de réalisation peut être plus particulièrement envisagé lorsque le LTR 5' rétroviral dérive d'un virus REV et, de préférence du 15 SNV, et la séquence nucléotidique est实质iellement homologue ou identique à la séquence présentée dans la SEQ ID NO: 2, commençant au nt 1 et se terminant au nt 578 ou commençant au nt 265 et se terminant au nt 578.

Selon un mode de réalisation avantageux, un vecteur rétroviral selon l'invention, comprend au moins :

20 (a) un LTR 5' rétroviral,
(b) une région d'encapsidation,
(c) de manière optionnelle, un premier gène d'intérêt suivi d'une région promotrice interne d'une origine différente de celle dudit LTR 5' rétroviral,
25 (d) un second gène d'intérêt,
(e) un site IRES,
(f) un troisième gène d'intérêt, et
(g) un LTR 3' rétroviral,

l'un au moins de la région d'encapsidation et du site IRES étant constitué

par ladite séquence nucléotidique en usage selon l'invention.

Dans le cas où le vecteur rétroviral selon l'invention comporte une cassette d'expression dirigée par une région promotrice interne, il est préférable pour favoriser l'expression génique, que celle-ci soit dans une orientation inverse par rapport aux LTRs 5' et 3' rétroviraux. On peut également inclure d'autres éléments, par exemple un autre site IRES et un autre gène d'intérêt ou une autre cassette d'expression.

Un vecteur rétroviral préféré selon l'invention comprend une région d'encapsidation dérivant d'un rétrovirus murin, notamment d'un MoMLV, ou d'un rétrotransposon de type VL30 et un site IRES comprenant une séquence nucléotidique实质上 homologue ou identique à la séquence présentée dans l'identificateur de séquence SEQ ID NO: 2 :

- (i) commençant au nucléotide 1 et se terminant au nucléotide 578,
- (ii) commençant au nucléotide 265 et se terminant au nucléotide 578,
ou
- (iii) commençant au nucléotide 452 et se terminant au nucléotide 578.

On peut citer en particulier les vecteurs rétroviraux dicistroniques de type pREV HW-3 et HW-6, dans lesquels la région d'encapsidation dérive d'un MoMLV et le site IRES est constitué par une séquence nucléotidique identique à la séquence présentée dans la SEQ ID NO: 2 commençant au nucléotide 265 et se terminant au nucléotide 578 ou commençant au nucléotide 452 et se terminant au nucléotide 578. Bien entendu, l'homme du métier peut faire varier les gènes d'intérêt selon l'effet thérapeutique recherché.

Aux fins de la présente invention, un gène d'intérêt en usage dans l'invention peut être obtenu d'un organisme eucaryote, procaryote ou d'un virus par toute technique conventionnelle de biologie moléculaire. Il peut coder pour un polypeptide correspondant à une protéine native telle que trouvée dans la nature homologue à la cellule hôte ou non, un fragment protéique, une protéine chimérique provenant de la fusion de polypeptides d'origines diverses ou un

mutant présentant des propriétés biologiques améliorées et/ou modifiées. Un tel mutant peut être généré par substitution, délétion et/ou addition d'un ou plusieurs résidus acides aminés. En outre, le polypeptide peut être (i) intracellulaire (ii) membranaire présent à la surface de la cellule hôte ou encore (iii) secrété hors de la cellule hôte et donc comprendre des éléments additionnels appropriés, comme une séquence codant pour un signal de sécrétion ou une région d'ancre transmembranaire.

On préfère tout particulièrement mettre en oeuvre un gène d'intérêt thérapeutique codant pour un produit d'expression capable d'inhiber ou retarder l'établissement et/ou le développement d'une maladie génétique ou acquise. Un vecteur selon l'invention est particulièrement destiné à la prévention ou au traitement de la mucoviscidose, de l'hémophilie A ou B, de la myopathie de Duchenne ou de Becker, du cancer, du SIDA, de maladies cardiovasculaires (resténose, arthériosclérose, ischémie...) et d'autres maladies infectieuses dues à un organisme pathogène : virus, bactérie, parasite ou prion. Les gènes d'intérêt utilisables dans la présente invention, sont ceux qui codent pour les protéines suivantes :

- une cytokine et notamment une interleukine (IL-2, IL-7, IL-10, IL-12...), un interféron, un facteur de nécrose tissulaire et un facteur de croissance et notamment hématopoïétique (G-CSF, GM-CSF),
- un facteur ou cofacteur impliqué dans la coagulation et notamment le facteur VIII, le facteur IX, le facteur von Willebrand, l'antithrombine III, la protéine C, la thrombine et l'hirudine,
- une enzyme et notamment la trypsine, une ribonucléase, la phosphatase alcaline (plap) et la β -galactosidase,
- un inhibiteur d'enzyme tel que l' α 1-antitrypsine et les inhibiteurs de protéases virales
- un produit d'expression d'un gène suicide comme la thymidine kinase du virus HSV (virus de l'herpès) de type 1, celui du gène *fur1*

- 13 -

et/ou *fcy1* de *Saccharomyces cerevisiae*, la ricine,

- un activateur ou un inhibiteur de canaux ioniques,
- une protéine dont l'absence, la modification ou la dérégulation de l'expression est responsable d'une maladie génétique, telle que la protéine CFTR, la dystrophine ou minidystrophine, l'insuline, l'ADA (adénosine diaminose), la glucocérébrosidase et la phénylhydroxylase,
- une protéine capable d'inhiber l'initiation ou la progression de cancers, telles que les produits d'expression des gènes supresseurs de tumeurs, par exemple les gènes p53, p73 et Rb,
- une protéine capable de stimuler une réponse immunitaire, un anticorps, les antigènes du complexe majeur d'histocompatibilité ou une immunotoxine,
- une protéine capable d'inhiber une infection virale ou son développement, par exemple les épitopes antigéniques du virus en cause ou des variants altérés de protéines virales susceptibles d'entrer en compétition avec les protéines virales natives,
- un récepteur cellulaire ou nucléaire ou un de leur ligand,
- un facteur de croissance (FGF pour Fibroblast Growth Factor, VEGF pour Vascular Endothelial cell Growth Factor...), et
- un inducteur d'apoptose (Bax...), un inhibiteur d'apoptose (Bcl2, BclX...), un agent cytostatique (p21, p16, Rb...), une nitric oxide synthase (NOS), une apolipoprotéine (apoAI, apoE...), une catalase, une SOD, un facteur agissant sur l'angiogénèse (PAI pour Plasminogen Activator Inhibitor...).

Par ailleurs, un gène d'intérêt en usage dans la présente invention, peut également coder pour un marqueur de sélection permettant de sélectionner ou identifier les cellules hôtes transfectées par un vecteur selon l'invention. On peut citer le gène *neo* (néomycine) conférant une résistance à l'antibiotique G418, le

gène *dhfr* (dihydrofolate réductase), le gène CAT (Chloramphenicol Acetyl Transférase) ou encore le gène *gpt* (xanthine phosphoribosyl).

D'une manière générale, on aura recours pour l'expression d'un ou des 5 gène(s) d'intérêt à un promoteur fonctionnel dans la cellule hôte considérée et, de préférence, une cellule humaine. Le choix du promoteur est très large et à la portée de l'homme du métier. Il peut s'agir d'un promoteur gouvernant naturellement l'expression d'un gène d'intérêt en usage dans la présente invention ou de tout autre 10 promoteur d'une origine quelconque. Par ailleurs, il peut être de nature constitutive ou régulable, notamment en réponse à certains signaux cellulaires tissu-spécifiques ou événements-spécifiques. Par exemple, il peut être avantageux de cibler l'expression du gène d'intérêt au niveau des cellules lymphocytaires dans le cadre du SIDA, des cellules pulmonaires dans le cadre de la mucoviscidose ou des 15 cellules musculaires dans le cadre des myopathies.

A titre d'exemples, les promoteurs convenant dans le cadre de la présente 20 invention peuvent être choisis parmi les promoteurs SV40 (Virus Simian 40), CMV (Cytomégalovirus), HMG (Hydroxyméthyl-Glutaryl Coenzyme A), TK (Thymidine kinase), les LTRs rétroviraux comme celui du MoMLV, RSV ou du MSV lorsqu'on met en oeuvre un vecteur rétroviral, les promoteurs adénoviraux E1A et tardif MLP (Major Late Promoteur) notamment dans le contexte d'un vecteur adénoviral, les promoteurs 7,5K, H5R, pK1L, p28 et p11 destinés à des 25 vecteurs poxviraux comme le virus de la vaccine, le promoteur PGK (Phosphoglycéro kinase), les promoteurs foie-spécifiques des gènes codant pour l' α 1-antitrypsine, le facteur IX, l'albumine et la transferrine, les promoteurs des gènes d'immunoglobulines qui permettent une expression dans les lymphocytes, et enfin les promoteurs des gènes codant pour le surfactant ou la protéine CFTR qui présentent une certaine spécificité pour les tissus pulmonaires. Il peut également s'agir d'un promoteur stimulant l'expression dans une cellule tumorale ou cancéreuse. On peut citer notamment les promoteurs des gènes MUC-1 surexprimé dans les cancers du sein et de la prostate (Chen et al., 1995, J. Clin.

Invest. 96, 2775-2782), CEA (pour carcinoma embryonic antigen) surexprimé dans les cancers du colon (Schrewe et al., 1990, Mol. Cell. Biol. 10, 2738-2748), tyrosinase surexprimé dans les mélanomes (Vile et al., 1993, Cancer Res. 53, 3860-3864), ERB-2 surexprimé dans les cancers du sein et du pancréas (Harris et al., 1994, Gene Therapy 1, 170-175), α -fétoprotéine surexprimée dans les cancers du foie (Kanai et al., 1997, Cancer Res. 57, 461-465), APC surexprimé dans les cancers colorectaux, BRCA-1 et 2 (Wooster et al., 1995, Nature 378, 789-792) surexprimés dans les cancers des ovaires et PSA (pour prostate specific antigen) surexprimé dans les cancers de la prostate.

10 Par ailleurs, le gène d'intérêt en usage dans la présente invention peut comporter d'autres séquences améliorant son expression, tant au niveau de la transcription que de la traduction ; par exemple une séquence activatrice de la transcription de type enhancer, une séquence intronique, un signal de terminaison de la transcription (polyA) et, comme indiqué précédemment, un signal de 15 sécrétion ou une région transmembranaire.

L'invention couvre également les particules virales générées à partir d'un vecteur viral selon l'invention. On procède généralement par transfection de celui-ci dans une lignée cellulaire adéquate. Si le vecteur viral utilisé est défectif pour la réplication, on aura recours à une lignée de complémentation. D'une manière 20 générale, l'homme du métier connaît les lignées pouvant être employées pour générer des particules virales infectieuses ainsi que le procédé à mettre en oeuvre selon le vecteur utilisé.

Par exemple, dans le cas d'un vecteur adénoviral, on peut avoir recours à la lignée 293 (Graham et al., 1977, J. Gen. Virol., 36, 59-72). S'agissant d'un 25 vecteur rétroviral, on peut envisager d'employer des lignées cellulaires écotropes, comme la lignée CRE (Danos et Mulligan, 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85, 6460-6464) ou GP+E-86 (Markowitz et al., 1988, J. Virol., 62, 1120-1124). Mais on préfère tout particulièrement mettre en oeuvre une lignée de complémentation amphétrope telle que la lignée PG13 (Miller et al., 1991, J. Virol., 65, 2220-2224)

- 16 -

ou Psi Env-am (Markowitz et al., 1988, T.A.A.P. Vol. CI, 212-218). Généralement, on récupère les particules virales infectieuses dans le surnageant de culture des cellules de complémentation transfectées.

L'invention s'étend également aux cellules comprenant un vecteur selon l'invention ou infectées par des particules virales infectieuses selon l'invention. Les méthodes de transfection sont bien connues de l'homme de l'art. On peut citer la technique de précipitation au phosphate de calcium, celle au DEAE dextrane, la microinjection ou l'encapsulation dans des véhicules lipidiques. D'autre part, les vecteurs selon l'invention peuvent être présents dans la cellule hôte sous forme intégrée dans le génome cellulaire ou sous forme d'épisomes aussi bien dans le noyau que dans le cytoplasme. La cellule selon l'invention est avantageusement une cellule eucaryote, notamment mammifère et, de préférence, une cellule humaine. Il peut s'agir d'une cellule primaire ou tumorale d'une origine hématopoïétique (cellule souche totipotente, leucocyte, lymphocyte, monocyte, macrophage ...), hépatique, épithéliale, fibroblaste, du système nerveux central et, tout particulièrement, d'une cellule musculaire (myoblaste, myocyte, cellule satellite, muscle lisse...), cardiaque, vasculaire, trachéale, pulmonaire ou du système nerveux central.

La présente invention concerne également l'usage thérapeutique d'un vecteur, d'une particule virale ou d'une cellule selon l'invention, pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée au traitement et/ou à la prévention d'une maladie traitable par thérapie génique, notamment d'une maladie génétique, d'une maladie acquise comme le cancer ou d'une maladie infectieuse.

Cependant, un tel usage n'est pas limité à une application de type thérapie génique somatique. En particulier, un vecteur selon l'invention peut être utilisé à d'autres fins comme la production par voie recombinante dans des cellules procaryotes ou eucaryotes de produit(s) d'expression codé(s) par au moins un des gènes d'intérêt. Par exemple, on peut envisager la coexpression de deux gènes d'intérêt dans un vecteur d'expression dicistronique utilisant une séquence

nucléotidique selon l'invention. La coexpression d'un gène de résistance à un antibiotique à titre de second cistron peut permettre d'augmenter l'expression d'un premier cistron. Il est possible d'obtenir un produit mature par la coexpression de deux gènes dont le produit d'expression de l'un permet la maturation du 5 polypeptide codé par l'autre (par exemple précurseur polypeptidique et une protéase clivant le précurseur en polypeptide mature). Dans ce cas, on peut avoir recours à des cellules procaryotes (E.coli ...), eucaryotes inférieures (levure, champignon, insecte ...) ou animales. Il s'agira ensuite de récolter et éventuellement purifier ledit produit d'expression d'intérêt du surnageant ou de la 10 culture cellulaire par les techniques conventionnelles. Une autre possibilité d'utilisation consiste en la production d'animaux transgéniques ayant intégré dans leur génome une cassette pour l'expression d'un ou plusieurs gènes d'intérêt et comprenant une séquence nucléotidique selon l'invention. Il peut s'agir de souris, rats, lapins, poissons, primates ou d'animaux de ferme (bovins, ovins, porcins ...) 15. Les techniques pour générer ces animaux transgéniques sont connues. Le polypeptide d'intérêt peut être récupéré de manière conventionnelle par exemple dans les fluides biologiques (sang, lait ... etc) de l'animal.

L'invention s'adresse également à une composition pharmaceutique comprenant à titre d'agent thérapeutique ou prophylactique un vecteur, une 20 particule virale ou une cellule selon l'invention ou un polypeptide d'intérêt obtenu conformément à l'utilisation selon l'invention, en association avec un véhicule acceptable d'un point de vue pharmaceutique.

Une composition pharmaceutique selon l'invention peut être fabriquée de manière conventionnelle. En particulier, on associe une quantité 25 thérapeutiquement efficace d'un tel agent à un support, un diluant ou un adjuvant acceptable. Elle peut être administrée selon n'importe quelle route d'administration et ceci en dose unique ou répétée après un certain délai d'intervalle. On préférera notamment l'administration intraveineuse, intramusculaire, intrapulmonaire (éventuellement par aérosolisation) ou intratumorale. La quantité à administrer

sera choisie en fonction de différents critères, en particulier l'usage à titre de traitement ou de vaccin, la voie d'administration, le patient, le type de maladie à traiter et son état d'évolution, la durée du traitement, le vecteur retenu ...etc. A titre indicatif, une composition pharmaceutique selon l'invention comprend entre 10⁴ 5 et 10¹⁴ pfu (unité formant des plages), avantageusement entre 10⁵ et 10¹³ pfu et, de préférence, entre 10⁶ et 10¹¹ pfu de particules virales. Une composition à base de vecteur peut être formulée sous forme de doses comprenant de 0,01 à 100 mg d'ADN, de préférence, de 0,05 à 10 mg et, de manière tout à fait préférée, de 0,1 à 5 mg.

10 La formulation peut également inclure seul ou en combinaison un diluant, un adjuvant ou un excipient acceptable d'un point de vue pharmaceutique, de même qu'un agent de solubilisation, de stabilisation ou de conservation. La composition peut être présentée en dose unique ou en multidoses sous forme liquide ou sèche (lyophilisat...) susceptible d'être reconstituée de manière 15 extemporanée par un diluant approprié.

Par ailleurs, l'invention concerne une méthode de traitement de maladies génétiques, cancers et maladies infectieuses selon laquelle on administre une quantité thérapeutiquement efficace d'un vecteur, d'une particule virale ou d'une cellule selon l'invention à un patient ayant besoin d'un tel traitement. Selon un 20 premier protocole thérapeutique, on peut les administrer directement *in vivo*, par exemple par injection intraveineuse, intramusculaire, intratumorale ou par aérosolisation dans les poumons. De manière alternative, on peut adopter un protocole de thérapie génique *ex vivo* qui consiste à prélever les cellules d'un patient (cellules souches de la moelle osseuse, lymphocytes du sang 25 périphérique...), à les transfecter avec un vecteur selon l'invention et à les cultiver *in vitro* avant de les réimplanter au patient.

Enfin, l'invention concerne l'utilisation d'un vecteur, d'une particule virale ou d'une composition pharmaceutique selon l'invention pour la transfection ou l'infection de cellules pluripotentes, notamment de cellules pluripotentes du

système nerveux central.

L'invention est illustrée ci-après par référence aux figures suivantes.

La Figure 1 est une représentation schématique des plasmides monocistroniques utilisés comme matrices pour la synthèse *in vitro* d'ARN coiffés et non-coiffés. Ils contiennent le promoteur précoce du cytomégalovirus (Po CMV) utilisable pour l'expression *in vivo*, le promoteur du gène codant pour l'ARN polymérase du phage T7 (Po T7) utilisable pour les expériences *in vitro*, différentes portions de l'extrémité 5' non traduite (leader) du virus REV-A (1 à 578 pour pREV CB-95, 578 à 1 pour pREV CG-53, 1 à 578 déletées des nt 268 à 452 pour pREV CG-54, 265 à 578 pour pREV CG-55 et 452 à 578 pour pREV CG-56) et le gène LacZ (Δ LacZ) codant pour une β -galactosidase tronquée à l'extrémité C-terminale de masse moléculaire d'environ 46 kDa.

La Figure 2 est une représentation schématique des plasmides dicistroniques utilisés comme matrices pour la synthèse *in vitro* d'ARN coiffés et non-coiffés. Ils contiennent le promoteur précoce du cytomégalovirus (Po CMV) utilisable pour l'expression *in vivo*, le promoteur du gène codant pour l'ARN polymérase du phage T7 (Po T7) utilisable pour les expériences *in vitro*, le gène neo, différentes portions de l'extrémité 5' non traduite (leader) du virus REV-A (1 à 578 pour pREV CB-54, 578 à 1 pour pREV CG-50, 1 à 578 déletées des nt 268 à 452 pour pREV CG-52, 265 à 578 pour pREV CB-55 et 452 à 578 pour pREV CG-58) et le gène LacZ (Δ LacZ) codant pour une β -galactosidase tronquée à l'extrémité C-terminale de masse moléculaire d'environ 46 kDa.

La Figure 3 A est une représentation schématique des vecteurs rétroviraux dicistroniques possédant deux éléments d'origine rétrovirale différente, à titre d'IRES et de région d'encapsidation (E) et deux gènes d'intérêt comme les gènes rapporteurs plap codant pour la phosphatase alcaline placentaire et neo codant pour la neomycine phosphotransférase. B) Vecteurs rétroviraux de la série pREV HW possédant des LTRs dérivés de MLV et placés dans un contexte plasmidique pBR322. VL30E+ correspond à la région 5' non traduite de HaMSV et MoMLV

- 20 -

E+ correspond à la région d'encapsidation de MoMLV. C) Vecteur de référence pEMCV-CBTV ayant des LTR et la région d'encapsidation de MoMLV et l'IRES de EMCV. Dans tous les cas, les séquences sont numérotées par rapport au site cap (position +1) de l'ARN génomique.

5 La Figure 4 illustre l'effet de la rapamycine sur les activités A) phosphatase alcaline et B) neomycine phosphotransférase produites dans les cellules GP+E-86 non transfectées ou transfectées de manière stables par les différents vecteurs pREV HW ou pEMCV-CBTV (pCB100) et traitées par la rapamycine (boîtes pleines) ou non traitées (contrôle, boîtes pointillées).

10 La Figure 5 illustre l'optimisation du protocole de transduction appliquée aux cellules neuroectodermiques Dev. Le pourcentage de cellules Dev transduites par les virus pEMCV-CBTV (IRES EMCV) et pREV HW-3 (IRES REV-A) est déterminé par cytométrie de flux.

15 EXEMPLES

Les constructions ci-après décrites sont réalisées selon les techniques générales de génie génétique et de clonage moléculaire détaillées dans Sambrook et al. (1989, Molecular cloning : A Laboratory Manual, 2nd ed, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY) ou selon les recommandations du fabricant lorsqu'on utilise un kit commercial. Les techniques de PCR sont connues de l'homme de l'art et abondamment décrites dans PCR Protocols, a guide to methods and applications (Ed : Innis, Gelfand, Sninsky et White, Academic Press, Inc.). Les amplifications d'ADN plasmidique sont réalisées dans *Escherichia coli* HB101 souche 1035 (*recA*). Par ailleurs, la position des séquences REV-A utilisées dans les constructions est indiquée par référence à la molécule ARN, la position +1 correspondant au premier nucléotide de la molécule d'ARN, c'est à dire au site d'initiation de la transcription (Darlix et al., 1992, J. Virol. 66: 7245-7252).

EXEMPLE 1 : Identification d'un site IRES au niveau de l'extrémité 5'
leader de l'ARN de REV-A.

5 Des études de synthèse protéique *in vitro* ont été entreprises à l'aide d'une série de plasmides mono et dicistroniques contenant des fragments du leader 5' de l'ARN génomique REV-A afin de rechercher s'ils permettent la traduction de cistrons par liaison interne des ribosomes.

10 1. *Construction des plasmides mono et dicistroniques.*

Les fragments d'ADN correspondant aux séquences 1 à 578, 265 à 578 et 452 à 578 de l'ARN REV-A sont isolés par PCR à partir de la matrice pREVSC-1 (Darlix et al., 1992, J. Virol. 66, 7245-7252). On utilise des amorces appropriées que l'homme du métier peut concevoir, munies à leurs extrémités d'un site *NheI*. Après digestion par cette enzyme, les fragments PCR sont insérés en amont du gène *LacZ* dans le vecteur pEMCV-M260-837 (Berlioz et al., 1995, J. Virol. 69, 6400-6407) préalablement clivé par *NheI*. Le gène *LacZ* mis en oeuvre code pour un produit β -galactosidase tronqué à l'extrémité C-terminale. On obtient les plasmides monocistroniques pREV CB-95 (1-578), pREV CG-55 (265-578) et pREV CG-56 (452-578) illustrés à la Figure 1. Les plasmides dicistroniques pREV CB-54 (1-578), pREV CB-55 (265-578) et pREV CG-58 (452-578) sont représentés à la Figure 2 et résultent de l'insertion des fragments PCR précédents entre les gènes *neo* et *LacZ* de pEMCV-D260-837 (pCB101) (Berlioz et al., 1995, J. Virol. 69, 6400-6407) également soumis à une digestion par *NheI*. L'amplification des nt 1 à 578 délétés des séquences 268 à 452 est réalisée à partir du vecteur pREVSC-1 préalablement digéré par *KpnI* et *SacI*, traité par le fragment Klenow de l'ADN polymerase *d'E. coli* et religué. Le fragment amplifié digéré par *NheI* est cloné dans pEMCV-M260-837 en amont du gène *LacZ* ou entre les gènes *neo* et *LacZ* de pEMCV-D260-837, les

deux vecteurs ayant été digérés par *Nhe*I, pour donner respectivement pREV CG-54 (Fig 1) et pREV CG-52 (Fig 2). Enfin des plasmides contrôles monocistronique pREV CG-53 (Fig 1) et dicistronique pREV CG-50 (Fig 2) ont été construits par introduction du fragment PCR portant les séquences REV-A 5 1 à 578 dans les vecteurs précédents en orientation inverse (578-1). Dans l'ensemble des constructions contenant les séquences REV-A en orientation sens, l'initiation de la traduction de la β -galactosidase est sous le contrôle du codon AUG du gène gag de REV-A situé en position 574-576, alors que dans les plasmides contrôles, la synthèse de la β -galactosidase dépend d'un AUG placé 10 dans un contexte de Kozak favorable introduit par PCR.

2. Synthèse d'ARN et traduction *in vitro*.

Les ARN coiffés et non coiffés sont synthétisés à partir de 1 μ g d'ADN plasmidique linéarisé par *Ssp*I (position 1240 dans le gène LacZ) à l'aide de 15 l'ARN polymérase T7 (mMessage mMachineTM ou MAXIscriptTM, Ambion) dans un volume réactionnel de 20 μ l selon le protocole indiqué par le fournisseur. La transcription est stoppée par traitement de la matrice ADN par l'enzyme DNaseI suivi d'une précipitation des ARN en présence de chlorure de lithium. Les ARN sont repris dans 50 μ l de tampon TE (Tris-HCl 10 mM pH7,5, EDTA 1mM) avant d'être purifiés et désalés par passage sur une colonne 20 S-300 MicroSpinTM (Pharmacia BioTech) selon les indications du fournisseur. L'intégrité des ARN transcrits est vérifiée par électrophorèse sur gel d'agarose 0,7 % contenant du bromure d'éthidium (0,5 μ g/ml). La concentration finale en ARN est déterminée spectrophotométriquement.

Les ARN coiffés et non coiffés (10 μ g/ml) sont traduits dans le système 25 cellulaire RRL (Promega) utilisé à 50 % de sa concentration initiale en présence de 1 mCi de [³⁵S] méthionine par ml (Amersham) à 31°C pendant 1 h. Le mélange réactionnel est supplémenté par de l'acétate de potassium à une concentration finale de 120 mM. Par ailleurs, l'ARN luciférase est testé dans les

mêmes conditions réactionnelles (témoin positif). Un essai mené en absence d'ARN constitue le témoin négatif. En parallèle, on teste l'effet de la protéase L du virus FMDV (Foot and mouth disease virus) sur la traduction des ARN dicistroniques. Cette protéase clive le facteur d'initiation de la traduction eIF4G entre la glycine en position 479 et l'arginine en position 480 pour générer deux fragments peptidiques dépourvus d'activité initiatrice (Kirchweger et al., 1995, J. Virol. 68, 5677-5684). En outre, Ohlmann et al. (1995, Nucleic Acid Res. 23, 334-340 ; 1996, EMBO J. 15, 1371-1382) a montré que le traitement des lysats de réticulocyte par la protéase L inhibe la traduction *in vitro* des ARN cellulaires coiffés alors que l'initiation interne dirigée par l'IRES du cardiovirus n'est pas touchée. Ainsi si un élément IRES existe dans le leader 5' REV-A, la présence de la protéase L ne devrait pas affecter l'expression du cistron dont la traduction est sous sa dépendance. Dans ce cas, les essais mettent en oeuvre le système RRL Flexi (Promega) à 50 % de sa concentration initiale, 8 µg/ml d'ARN, 1 mCi de [³⁵S] méthionine par ml (Amersham) et 30 ng de protéase L recombinante et purifiée par les méthodes conventionnelles. Le mélange réactionnel est supplémenté par du chlorure de potassium à une concentration finale de 80 mM. La réaction est poursuivie à 31 °C pendant 1 h.

Les échantillons sont dénaturés par la chaleur dans 62,5 mM de Tris-HCl pH 6,8, 2 % de sodium dodecyl sulphate (SDS), 10 % de glycérol, 5 % de β-mercaptopéthanol et 0,02 % de bleu de bromophénol et les protéines marquées analysées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide 12 % (poids/vol), 0,2 % SDS. Le produit du gène neo et la β-galactosidase migrent à une masse moléculaire d'environ 28 et 46 kDa respectivement. L'efficacité de la traduction coiffe-dépendante et indépendante est quantifiée par scanographie (Phospho-Imageur Storm 840, version 4.00, Molecular Dynamics ; Image Quant TM version 1.1, Molecular Dynamics). Dans le cas des vecteurs dicistroniques, l'intensité du marquage du produit d'expression du second cistron (β-galactosidase) dont la traduction est médiée par l'IRES est évaluée après

- 24 -

standardisation du niveau d'expression du produit neo.

On observe que la traduction des ARN non coiffés obtenus à partir des plasmides monocistroniques pREV CB-95, pREV CG-53, pREV CG-54, pREV CG-55 et pREV CG-56 est aussi efficace que celle des ARN coiffés. Cependant, 5 comme attendu, la quantité de β -galactosidase générée à partir du plasmide pREV CG-53 dans lequel les séquences REV-A (1 à 578) sont en orientation antisens est beaucoup plus faible que celle obtenue avec les constructions utilisant une séquence REV-A dans l'orientation sens. Lorsque les fragments REV-A sont mis en oeuvre d'une manière dicistronique entre les gènes neo et 10 LacZ, l'expression de la β -galactosidase n'apparaît qu'en présence d'un IRES fonctionnel (pREV CB-54, pREV CB-55, et pREV CG-52) alors que celle du premier cistron (neo) est efficace dans tous les cas (y compris pREV CG-50). Des essais compatifs de traduction *in vitro* menés avec les vecteurs précédents et le plasmide pEMCV-D260-837 comprenant l'IRES EMCV de référence 15 montrent que les fragments REV-A 1-578, 265-578 et 452-578 sont capables d'initier la traduction du second cistron d'une manière plus efficace que celle dirigée par l'IRES EMCV. Par ailleurs, le traitement des lysats de réticulocytes par la protéase L s'accompagne d'une inhibition de l'expression coiffe- dépendante du gène neo alors que l'expression de la β -galactosidase dépendante 20 de l'IRES est sensiblement augmentée. Pour le témoin pREV CG-50, on observe également l'inhibition de l'expression neo alors que l'expression de la β - galactosidase est à peine détectable que le traitement à la protéase L ait lieu ou non. A titre indicatif, l'effet de la protéase sur l'expression des deux gènes rapporteurs est illustré ci-après.

25

Tableau 1 : Rapport de l'expression des gènes en présence et en absence de protéase L de FMDV.

- 25 -

5

Construction	neo	LacZ
pREV CG-50	- 51,85	- 5,53
pREV CB-54	- 55,36	+ 40,24
pREV CB-55	- 34,65	+ 84,42
pREV CG-58	- 45,07	+ 57,51
pEMCV-D260-837	- 79,51	+ 33,93

EXEMPLE 2 : Vecteurs rétroviraux comprenant une séquence IRES
REV-A

10

On a construit une série de vecteurs rétroviraux utilisant les séquences REV-A à titre de sites IRES ou d'éléments augmentant l'encapsidation. La Figure 3 illustre les vecteurs de la série pREV HW possédant des LTRs de type MoMLV et les vecteurs témoins utilisés dans les expériences décrites ci-après.

15 Bien que ceux-ci ne soient pas représentés, on a également construit des vecteurs désignés pMC qui diffèrent des pREV HW uniquement par le fait que leurs LTRs sont d'origine SNV et des contrôles négatifs dans lesquels les séquences REV-A sont positionnées en orientation reverse (3' -> 5') par rapport aux LTRs. Pour toutes les étapes de biologie moléculaire, ces vecteurs sont

20 introduits dans le plasmide pBR322.

1. Construction des vecteurs rétroviraux.

Le vecteur témoin pEMCV-CBTV (pBC100) est un vecteur dicistronique comprenant, outre les LTRs et la région d'encapsidation dérivés de MoMLV, 25 le gène codant pour la phosphatase alcaline placentaire (plap) dont la traduction est coiffe-dépendante et le gène neo dont la traduction est dépendante du site IRES EMCV (Torrent et al., 1996, Human Gene Therapy 7, 603-611).

Les vecteurs pREV HW ont été obtenus de la façon suivante :
 pREV HW-1 : le fragment REV-A s'étendant des nt 265 à 578 généré par PCR

et digéré par *NheI* est cloné entre les gènes *plap* et *neo* de pMLV-CB71 (Berlioz et Darlix, 1995, *J. Virol.* 69, 2214-2222).

5 pREV HW-2 : le fragment *EcoRI* de pVL CBT5 (Torrent et al., 1996, *Human Gene Therapy* 7, 603-611) portant le LTR 5' MoMLV et les séquences d'encapsidation de VL30 est introduit dans le vecteur pREV HW-1 linéarisé par *EcoRI*.

pREV HW-3 : le fragment *EcoRI* de pEMCV-CBT5 contenant le LTR 5' et les séquences d'encapsidation de MoMLV est inséré dans le vecteur pREV HW-1 linéarisé par *EcoRI*.

10 pREV HW-4 : le fragment REV-A s'étendant des nt 452 à 578 généré par PCR et digéré par *NheI* est cloné entre les gènes *plap* et *neo* de pMLV-CB71.

pREV HW-5 : le fragment *EcoRI* de pVL CBT5 portant le LTR 5' MoMLV et les séquences d'encapsidation de VL30 est introduit dans le vecteur pREV HW-4 linéarisé par *EcoRI*.

15 pREV HW-6 : le fragment *EcoRI* de pEMCV-CBT5 contenant le LTR 5' et les séquences d'encapsidation de MoMLV est inséré dans le vecteur pREV HW-4 linéarisé par *EcoRI*.

20 Les vecteurs de la série pMC sont obtenus selon le schéma de construction suivant : Les LTRs SNV sont générés par PCR à partir du plasmide REV-A 2-20-6 (O'Rear et Temin, 1982, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79, 1230-1234 ; Darlix et al., 1992, *J. Virol.* 66, 7245-7252). Le gène *neo* est isolé de pMLV-CB71 par digestion avec *SalI* et *BamHI* puis introduit entre les mêmes sites du vecteur pUC19 (Gibco BRL). Le LTR 5' du SNV (nt 1 à 861) est digéré par *HindIII* et *SalI*, et inséré dans pUC19-*neo* préalablement clivé par ces mêmes enzymes. Le LTR 3' SNV (nt 7230-8300) digéré par *SmaI* et *EcoRI* est cloné dans le vecteur précédent pour donner pCG-61 contenant LTR 5' SNV-*neo*-LTR 3' SNV. En parallèle, on génère un vecteur désigné pCG-62 qui diffère du précédent par la délétion des séquences env (nt 7230-7691) obtenu par traitement *BglII-AvrII*, Klenow et religation. Le gène *plap* isolé du clone Cl-12AP (DGoff)

est introduit entre les sites *EcoRI* et *XbaI* d'un plasmide bluescript préalablement déléte du site *SaII* (digestion *EcoRI-XhoI*) avant d'être réisolé sous la forme d'un fragment *KpnI-SaII* et cloné entre les mêmes sites de pCG-61 et pCG-62, pour donner pCG-63 et pCG-64 respectivement. Le gène *LacZ* est obtenu par 5 digestion partielle de pREV CB-95 par les enzymes *SaII* et *BamHI*. Son insertion entre les sites *SaII* et *BamHI* de pCG-61 et pCG-62 donne lieu à pCG-65 et pCG-66 respectivement. Enfin, le bloc LTR-Gene-LTR est isolé de chaque plasmide pCG-62, pCG-64 et pCG-66 par digestion *HindIII-EcoRI* pour être inséré dans le vecteur pBR322 clivé par ces mêmes enzymes. On génère pMC1, 10 pMC2 et pMC3.

*2. Génération de particules virales infectieuses et détermination du titre viral et de l'expression des gènes reporteurs *plap* et *neo*.*

La lignée de complémentation écotope GP+E-86 (Markowitz et al., 15 1988, J. Virol., 62, 1120-1124) et les cellules cibles NIH3T3 (cellules fibroblastiques de souris) disponibles à l'ATCC, sont cultivées à 37°C en présence de 5% de CO₂ dans du milieu DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Gibco BRL) complémenté avec 10% de sérum de veau de nouveau-né. Les cellules helper GP+E-86 et les cellules cibles NIH3T3 sont mises en culture 20 la veille de la transfection et de l'infection. Les infections virales sont réalisées selon le protocole conventionnel décrit dans la littérature.

20 µg de vecteurs pREV HW-1 à 6 ainsi que de vecteur de référence pEMCV-CBTV sont transfectés en parallèle dans les cellules GP+E-86 (5x10⁵ cellules par boîte de 10cm) selon la méthode de Chen et Okyama (1987, Mol. 25 Cell. Biol., 7, 2745-2753 ; 1988, Bio/Techniques 6, 632-637). Différentes dilutions de surnageants des cultures GP+E-86 stables ou transitoires sont utilisées pour infecter les cellules cibles NIH3T3 ensemencées la veille de l'infection à raison de 2x10⁴ cellules par puits. Au préalable, les surnageants vitaux ont été filtrés (sur filtres de 0,45 µm) et mis en présence de polybrène à

une concentration finale de 8 μ g/ml. L'infection est poursuivie toute la nuit à 37°C et le jour suivant, les cellules sont lavées et cultivées dans du milieu frais. Après 48 h, les cellules sont placées en milieu sélectif (1 mg/ml de G418) ou colorées pour déterminer le nombre de cellules exprimant la phosphatase alcaline 5 plap. On procède tout d'abord à une fixation dans du tampon PBSx1 contenant 2% de formaldéhyde et 0,2% de glutaraldéhyde. Après deux rinçages dans du PBSx1 suivis d'une incubation de 30 min à 65°C dans du PBSx1, les cellules sont lavées à deux reprises dans du tampon AP (0,1 M Tris-HCl pH 9,5, 0,1 M NaCl, 50 mM MgCl₂ dans du PBSx1) et placées 5 h dans la solution de 10 coloration (0,1 mg/ml de 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate (BCIP), 1 mg/ml d'un sel de térazolium de Nitroblue (NBT) et 1 mM de Levamisol dans du tampon AP). Ces expériences de coloration histochimique confirment l'expression de la phosphatase alcaline dans les cellules helper GP+E-86 et dans les cellules cibles NIH3T3.

15 Le titre des virus recombinants est déterminé après transfection des cellules écotypes GP+E-86. Après deux jours d'incubation, le surnageant viral est récolté et utilisé pour déterminer le titre viral (expression transitoire). Ensuite, les cellules transfectées sont sélectionnées au G418 pendant un mois. Après cette sélection, on détermine le titre viral sur le surnageant récolté 20 (expression stable). Celui-ci correspond au nombre de particules infectieuses par ml de surnageant. Par la méthode des dilutions limites, les cellules cibles NIH3T3 sont infectées avec des dilutions en série de surnageant viral et, après deux jours d'incubation, les cellules sont colorées histochimiquement et comptées. Les résultats suivants sont obtenus (Tableau 2):

Vecteur	Expression transitoire (cfu/ml)	Expression stable (cfu/ml)
pREV HW-1	-	-
pREV HW-2	$0,2 \times 10^4$	$3,2 \times 10^6$
pREV HW-3	$1,6 \times 10^4$	$1,4 \times 10^9$
5 pREV HW-4	-	-
pREV HW-5	$1,3 \times 10^4$	$6,5 \times 10^5$
pREV HW-6	$2,0 \times 10^4$	$4,5 \times 10^8$
pEMCV-CBTV	$1,1 \times 10^4$	$2,1 \times 10^8$

10 Les vecteurs pREV HW-1 et pREV HW-4 dépourvus de région d'encapsidation conventionnelle sont incapables de produire des particules virales infectieuses après transfection dans la lignée helper MLV (GP+E-86). Cependant, on indique que le vecteur pMC1 peut être encapsidé dans des particules virales SNV après transfection de la lignée helper SNV D17-C3A2 (par exemple ATCC CRL8468), indiquant que les séquences REV-A s'étendant des nt 265 à 578 peuvent être utilisées dans ce contexte à titre de région d'encapsidation. Les vecteurs rétroviraux comprenant à la fois une séquence REV-A (265-578 ou 452-578) et une région d'encapsidation conventionnelle produisent des particules virales à un titre élevé (pREV HW-2, 3, 5 et 6).

15 20 Cependant l'association avec la région d'encapsidation de MLV s'avère particulièrement avantageuse puisqu'elle donne des titres viraux 2 (pREV HW-6) à 5 fois (pREV HW-3) plus élevés que le vecteur de référence pEMCV-CBTV combinant cette même région d'encapsidation et l'IRES EMCV. De plus, la comparaison des données obtenues avec les vecteurs identiques variant uniquement au niveau du segment REV-A mis en oeuvre (pREV HW-2 et pREV HW-5 ou pREV HW-3 et pREV HW-6) laisse supposer que la séquence allant des nt 265 à 578 est capable de coopérer avec la région d'encapsidation et ainsi améliorer l'encapsidation des ARN viraux et en conséquence les titres viraux. Un élément interagissant d'une manière positive avec l'encapsidation pourrait être

- 30 -

présent entre les nt 452 et 265 dans le génome REV-A.

3. Analyse des virus recombinants par microscopie électronique.

La morphologie des virions recombinants pREV HW produits après transfection de la lignée GP+E-86 par les vecteurs correspondants est analysée par microscopie électronique. On utilise à titre de témoins les virus obtenus de pEMCV-CBTV dans les mêmes conditions et les rétrovirus sauvages obtenus après infection des cellules NIH3T3 avec la souche FMLV-29 (Friend murine leukemia virus souche 29). Les résultats de microscopie indiquent que le contenu en ARN n'affecte pas la morphologie des virus recombinants.

4. Effet de la rapamycine sur l'expression des cistrons plap et neo.

Les cellules GP+E-86 sont transfectées d'une manière stable par 20 µg de vecteurs de la série pREV HW ou pEMCV-CBTV et cultivées en conditions sélectives (G418) pendant 15 jours. A 70 à 80 % de confluence, elles sont mises en présence de rapamycine à une concentration finale de 20 ng/ml. Cette dernière a un effet inhibiteur sur la traduction coiffe-dépendante variant de 15 à 40 % selon la lignée cellulaire (Beretta et al., 1996, EMBO J. 15, 658-664) mais n'affecte pas la traduction cap-indépendante. Les extraits cellulaires sont préparés classiquement après 20 h d'incubation. Brièvement, les cellules sont lavées deux fois dans du PBSx1, placées dans 1 ml de TEN (40 mM Tris-HCl pH7,5, 1 mM EDTA, 50 mM NaCl) pour une boîte de 10 cm puis récupérées par grattage et centrifugées à faible vitesse. Le culot est repris dans 100 µl de Tris-HCl 0,25 M, pH8 et soumis à une lyse cellulaire par 3 cycles de congélation-décongélation. Après centrifugation 10 min à 14000 g, le surnageant est récupéré et peut être conservé à -70°C en attendant de procéder aux tests enzymatiques. La concentration finale en protéine est déterminée par le test Micro BCA (Pierce). L'activité enzymatique plap des extraits cellulaires est évaluée spectrophotométriquement (kit alcaline phosphatase, BIORAD). Les

unités plap sont déterminées par rapport à un standard constitué par la phosphatase alcaline d'intestin de veau (Boehringer Mannheim). Les activités neo sont mesurées par le transfert de phosphate marqué au $[\gamma-^{32}\text{P}]$ sur la neomycine (Ramesh et Osborne, 1991, *Anal. Biochem.* 193, 316-318). Les 5 résultats de l'expression des gènes plap et neo mesurés en absence et en présence de rapamycine sont illustrés à la Figure 4 et présentés dans le Tableau 3.

Tableau 3 : effet de la rapamycine sur l'expression des cistrons plap et neo exprimé en % par rapport aux cellules non traitées.

	Lignée cellulaire	phosphatase alcaline	Neomycine phosphotransférase
10	GP+E-86	-	-
	pREV HW-1	-40,9	+21,5
	pREV HW-2	+21,3	+26,7
	pREV HW-3	+34,8	-6,5
	pREV HW-4	-94,6	+3,0
	pREV HW-5	+66,7	+46,9
15	pREV HW-6	+46,1	+49,6
	pEMCV-CBTV	-2,6	+20,5

Dans les vecteurs pREV HW-1 et pREV HW-4, la présence de 20 rapamycine réduit la traduction cap-dépendante et augmente celle dépendante de l'IRES. Cette stimulation peut s'expliquer par une moindre compétition pour la machinerie traductionnelle en présence de rapamycine. Lorsque deux éléments IRES sont présents, l'addition de rapamycine s'accompagne d'une augmentation de l'expression des deux gènes. Cependant, les données quantitatives 25 d'expression indiquent que l'activité relative des IRES est différente, ce qui suggère une compétition entre eux pour les ribosomes.

En résumé, l'ensemble des données montrent la présence d'un site IRES

efficace dans le leader 5' des ARN du virus REV-A et, probablement d'un élément interagissant de manière positive avec l'encapsidation. L'élément IRES minimum est contenu au sein d'une séquence de 129 nt (positions 452 à 578).

5 EXEMPLE 3 : Transduction de cellules neuroectodermales humaines
pluripotentes

Cette étude est réalisée dans la lignée cellulaire humaine Dev qui constitue un modèle cellulaire du système nerveux central, cible potentielle pour la thérapie 10 génique humaine. Les cellules Dev dérivent d'une tumeur primaire humaine d'origine neuroectodermale (PNET) et se comportent comme des cellules souches pluripotentes (Derrington et al., 1997, Oncogene, sous presse). De plus, il est possible d'induire leur différenciation soit en neurones soit en cellules gliales (Derrington et al., 1997, *supra* ; Dufay et al., 1994, Eur. J. Neurosci. 6, 1633-1640 15 ; Giraudon et al., 1993, Neurosci. 52, 1069-1079). Dans cette étude, le vecteur dicistronique pREV HW-3 (IRES REV-A 265-578) est comparé au vecteur contrôle pEMCV CBTV (IRES EMCV).

Les cellules Dev sont infectées avec une dilution au 1/100 de surnageant viral pendant 2 jours puis fixées, colorées histochimiquement selon le protocole 20 ci-dessus et comptées. Le titre viral est similaire pour les deux vecteurs et de l'ordre de 3×10^3 TU/ml. Les unités de transduction (TU/ml) correspondent au rapport du nombre de colonies x dilution du rétrovirus infectant par le volume total (ml) du vecteur dilué placé sur les cellules.

On vérifie également l'expression des deux cistrons neo et plap. Pour ce faire, les cellules cibles sont comme précédemment transduites avec une dilution 25 1/100 de surnageant viral et sélectionnées en présence de G418 pendant 3 semaines. On détermine l'intensité de la fluorescence par cytométrie de flux avec un anticorps spécifique pour la plap (DAKO). On indique qu'un anticorps polyclonal convient. Les résultats montrent la production de l'enzyme plap par les

cellules transduites et sélectionnées au G418. En parallèle, la synthèse de l'enzyme plap est confirmée par coloration histochimique des clones résistants.

Ces données montrent que le vecteur dicistronique pREV HW-3 peut transduire de façon efficace des cellules humaines dérivées du système nerveux central et y transférer des gènes d'intérêt et confirment la fonctionnalité du site IRES REV-A pour médier la production du produit d'expression du second cistron.

Par ailleurs, différents protocoles de transduction ont été étudiés dans un but d'optimisation. Les variantes sont les conditions de culture des cellules en présence ou en absence de sérum et en présence ou en absence de facteurs de croissance (FGF-2) et la production des virus en présence ou en absence de sérum. Les six protocoles suivants ont été comparés avec les virus pEMCV CBTV et pREV HW-3 possédant l'enveloppe polytrope GaLV (production sur cellules PG13, ATCC CRL-10686).

15 Protocole 1 : cellules cultivées en milieu avec sérum (10 %), virus produit en présence de sérum (10 %).

Protocole 2 : cellules cultivées en milieu avec sérum (10 %), virus produit en absence de sérum.

Protocole 3 : cellules cultivées en milieu sans sérum, virus produit en présence 20 de sérum (10 %).

Protocole 4 : cellules cultivées en milieu sans sérum, virus produit en absence de sérum.

Protocole 5 : cellules cultivées en milieu sans sérum, virus produit en présence de sérum (10 %), présence de FGF-2.

25 Protocole 6 : cellules cultivées en milieu sans sérum, virus produit en absence de sérum, présence de FGF-2.

Le pourcentage de cellules Dev transduites est déterminé par cytométrie de flux (Figure 5). Le pourcentage de cellules transduites par pREV HW-3 dépasse 30% lorsque la culture des cellules Dev est effectuée en absence de sérum.

Un tel % n'est pas atteint avec le virus conventionnel pEMCV CBTV. L'ajout de facteurs de croissance est également avantageux. Parmi tous les protocoles mis en oeuvre, le protocole 5 permet de transduire plus de 50 % de cellules Dev. Ces résultats montrent que les vecteurs polycistroniques de l'invention portant l'IRES 5 REV-A sont fonctionnels pour transduire les cellules neuroectodermiques pluripotentes. Le développement de protocoles pour la transduction efficace de lignées cellulaires humaines est un point essentiel dans l'élaboration des stratégies de transfert de gènes.

L'expression des cistrons plap et neo est évaluée après différenciation 10 neuronale et gliale (Derrington et al., 1997, *supra*). Brièvement, les cellules Dev adoptent un phénotype différencié en présence de sérum et de FGF-2 alors que lorsque la culture est réalisée en absence de sérum, le phénotype est pluripotent. Les résultats d'immunofluorescence avec un anticorps spécifique anti-plap sur 15 cellules Dev transduites, sélectionnées au G418 et différenciées montrent une expression de la plap dans les cellules neuronales et gliales. Ces données suggèrent que l'état de différenciation n'inhibe pas la traduction médiée par l'IRES REV-A.

- 35 -

LISTE DE SEQUENCES

(1) INFORMATION GENERALE:

(i) DEPOSANT:

- (A) NOM: INSERM
- (B) RUE: 101 rue de Tolbiac
- (C) VILLE: Paris cedex 13
- (E) PAYS: France
- (F) CODE POSTAL: 75654
- (G) TELEPHONE: 01 44 23 60 00
- (H) TELECOPIE: 01 45 85 68 56

(ii) TITRE DE L' INVENTION: Nouveau site interne d'entrée des ribosomes et vecteur le contenant.

(iii) NOMBRE DE SEQUENCES: 2

(iv) FORME LISIBLE PAR ORDINATEUR:

- (A) TYPE DE SUPPORT: Tape
- (B) ORDINATEUR: IBM PC compatible
- (C) SYSTEME D' EXPLOITATION: PC-DOS/MS-DOS
- (D) LOGICIEL: PatentIn Release #1.0, Version #1.25 (OEB)

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 1:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 940 paires de bases
- (B) TYPE: acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ARN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iv) ANTI-SENS: NON

(vi) ORIGINE:

- (A) ORGANISME: Reticuloendotheliosis virus
- (B) SOUCHE: type A (REV-A)
- (C) INDIVIDUEL ISOLE: leader 5' de l'ARN génomique REV-A

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 1:

AAUGUGGGAG GGAGCUCCGG GGGGAAUAGC GCUGGCUCGC UAACUGCCAU AUUAGCUUCU	60
GUAAUCAUGC UUGCUUGCCU UAGCCGCCAU UGUACUUGAU AUAUUUCGCU GAUAUCAUUU	120
CUCGGAAUCG GCAUCAUUUC UCGGAAUCGG CAUCAAGAGC AGGCUCAUAG ACCAUAAAAG	180
GAAAUGUUCG UUGGAGGCAGA GCAUCAGACC ACUUGCGCCA UCCAAUCACG AGCAAACACG	240
AGAUCGAACU AUCAUACUGA GCCAAUGGUU GUAAAGGGCA GAUGCUAUCC UCCAAUGAGG	300
GAAAAUGUCA UGCAACAUCC UGUCCUGUAA GCGGCUAUAU AAGCCAGGUG CAUCUCUUGC	360

- 36 -

UCGGGGUCGC CGUCCUACAC AUUGUUGUGA CGCGCGGCC AGAUUCGAAU CUGUAUAAGA	420
AGUUUUUUUUC UUCUUAUCC UCAGAUUGGC AGUGAGAGGA GAUUUUGUUC GUGGUGUAGG	480
CUGGCCUACU GGGUGGGUA GGGGUCCGGA CUGAAUCCGU AGUAUUUCGA UACAACAUU	540
GGGGGCUCGU CGGGGAUUCU UCCCCAUCGG CAGAAGUGCC UACUGUUUCU UCGAACUCCG	600
GCGCCGGUAA GUAAGUACUU GAUUUUGGUA CCUCGCGAGG GUUUGGGAGG AUCGGAGUGG	660
CGGGACGCUG CGGGGAAGCU CCACCUCCGC UCAGCAGGGG ACGCCCUGAU CUGAGCUCUG	720
UGGUAUCUGA UUGUUGUUGG ACCGUCUCCA AGACGGUGAU AAUUAAGUC GUGGUUUGUG	780
UGUUUGUUUG UUACCUUGUG UUUGUUCGUC ACUUGUCGAC AGCGCCCUGC GAAUUGGUGU	840
GCCCCACACCG CGCGGCUUGC GAAUAAUACU UUGGAGAGUC UUUUGCCUCC AGUGUCUUCC	900
GUUUGUACUC GUCCUCCUCU CCCUCUCCGG CGGGGAUGGG	940

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 2:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 578 paires de bases
- (B) TYPE: acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ARN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: NON

(vi) ORIGINE:

- (A) ORGANISME: Reticuloendotheliosis virus
- (B) SOUCHE: type A (REV-A)

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 2:

GGGGUCGCCG UCCUACACAU UGUUGUGACG CGCGGCCAG AUUCGAAUCU GUAAUAAAAG	60
UUUUUUUUCUU CUAUAUCCUC AGAUUGGCAG UGAGAGGAGA UUUUGUUCGU GGUGUAGGCU	120
GGCCUACUGG GUGGGGUAGG GGUCGGACU GAAUCCGUAG UAUUUCGAUA CAACAUUUGG	180
GGGCUCGUCC GGGAUUCCUC CCCAUCGGCA GAAGUGCCUA CUGUUUCUUC GAACUCCGGC	240
GCCGGUAAGU AAGUACUUGA UUUUGGUACC UCGCGAGGGU UUGGGAGGAU CGGAGUGGCG	300
GGACGCUGCC GGGAAAGCUCC ACCUCCGCUC AGCAGGGGAC GCUCGAUCU GAGCUCUGUG	360
GUACUGAUU GUUGUUGGAC CGUCUCCAAG ACGGUGAUAA UAUAGUCGU GGUUUGUGUG	420
UUUGUUUGUU ACCUUGUGUU UGUUCGUCAC UUGUCGACAG CGCCCUGCGA AUUGGUGUGC	480
CCACACCGCC CGGCUCUGCGA AUAAUACUU GGAGAGUCUU UUGCCUCCAG UGUCUUCCGU	540
UUGUACUCGU CCUCCUCUCC CUCUCCGGCC GGGGAUGGG	578

Revendications

1. Utilisation d'une séquence nucléotidique dérivée de tout ou partie de l'extrémité 5' de l'ARN génomique d'un rétrovirus de type C à l'exception des virus de la leucémie murine de Friend (FMLV) et de Moloney (MoMLV), à titre de site interne d'entrée des ribosomes (IRES) dans un vecteur et/ou pour permettre ou améliorer l'encapsidation d'un vecteur rétroviral.
- 10 2. Utilisation selon la revendication 1, selon laquelle le rétrovirus de type C est sélectionné parmi les virus REV, MSV, MHV, MEV, FMOV, AMLV, MEELV, SFFV, RASV, FLV, FSV, EFLV, SSV, GALV et BAEV.
- 15 3. Utilisation selon la revendication 2, selon laquelle ladite séquence nucléotidique dérive de tout ou partie de l'extrémité 5' de l'ARN génomique d'un virus de la réticuloendothéliose.
- 20 4. Utilisation selon la revendication 3, selon laquelle ladite séquence nucléotidique dérive de tout ou partie de l'extrémité 5' de l'ARN génomique d'un virus de la réticuloendothéliose aviaire et, notamment de type A.
- 25 5. Utilisation selon l'une des revendications 1 à 4, selon laquelle ladite séquence nucléotidique est实质iellement homologue ou identique à tout ou partie de la séquence présentée dans l'identificateur de séquence SEQ ID NO: 1.
6. Utilisation selon la revendication 5, selon laquelle ladite séquence nucléotidique est实质iellement homologue ou identique à la séquence présentée dans l'identificateur de séquence SEQ ID NO: 2 :

- (i) commençant au nucléotide 1 et se terminant au nucléotide 578,
- (ii) commençant au nucléotide 265 et se terminant au nucléotide 578, ou
- (iii) commençant au nucléotide 452 et se terminant au nucléotide 578.

5 7. Utilisation selon la revendication 6, selon laquelle ladite séquence nucléotidique est identique à la séquence présentée dans l'identificateur de séquence SEQ ID NO: 2 :

- (i) commençant au nucléotide 1 et se terminant au nucléotide 578,
- (ii) commençant au nucléotide 265 et se terminant au nucléotide 578, ou
- 10 (iii) commençant au nucléotide 452 et se terminant au nucléotide 578.

8. Vecteur pour l'expression d'un ou plusieurs gène(s) d'intérêt comprenant ladite séquence nucléotidique en usage selon l'une des revendications 1 à 7.

15 9. Vecteur selon la revendication 8, caractérisé en ce qu'il s'agit d'un vecteur plasmidique ou d'un vecteur viral dérivé d'un virus sélectionné parmi le groupe des poxvirus, adénovirus, baculovirus, virus de l'herpès, virus associé à un adénovirus et rétrovirus.

20 10. Vecteur selon la revendication 8 ou 9, dérivant d'un rétrovirus et comprenant au moins les éléments suivants associés d'une manière fonctionnelle : un LTR 5' et un LTR 3' rétroviraux, un ou plusieurs gène(s) d'intérêt, et ladite séquence nucléotidique telle que définie dans l'une des revendications 1 à 7 pour permettre ou améliorer l'encapsidation dudit vecteur dans une particule virale et/ou à titre de site IRES pour permettre ou améliorer l'expression d'un gène d'intérêt positionné en aval de ladite séquence nucléotidique.

11. Vecteur rétroviral selon la revendication 10, dans lequel ladite séquence nucléotidique est à titre de site IRES et comprenant en outre une région d'encapsidation hétérologue à ladite séquence nucléotidique.

5 12. Vecteur rétroviral selon la revendication 10 ou 11, comprenant au moins :

- (a) un LTR 5' rétroviral,
- (b) une région d'encapsidation,
- (c) de manière optionnelle, un premier gène d'intérêt suivi d'une région promotrice interne une origine différente de celle dudit LTR 5' rétroviral,
- (d) un second gène d'intérêt,
- (e) un site IRES,,
- (f) un troisième gène d'intérêt, et
- (g) un LTR 3' rétroviral,

15 l'un au moins de la région d'encapsidation et du site IRES étant constitué par ladite séquence nucléotidique en usage selon l'une des revendications 1 à 7.

20 13. Vecteur rétroviral selon la revendication 12, dans lequel la région promotrice interne, le second gène d'intérêt, le site IRES et le troisième gène d'intérêt sont dans une orientation inverse par rapport aux LTRs 5' et 3' rétroviraux.

25 14. Vecteur rétroviral selon la revendication 12 ou 13, dans lequel la région d'encapsidation dérive d'un rétrovirus murin, notamment d'un MoMLV, ou d'un rétrotransposon de type VL30 et le site IRES comprend une séquence nucléotidique telle que définie à la revendication 6.

15. Vecteur rétroviral selon la revendication 14, dans lequel la région

5 d'encapsidation dérive d'un MoMLV et le site IRES comprend une séquence nucléotidique identique à la séquence présentée dans l'identificateur de séquence SEQ ID NO: 2 commençant au nucléotide 265 et se terminant au nucléotide 578 ou commençant au nucléotide 452 et se terminant au nucléotide 578.

10 16. Vecteur rétroviral selon la revendication 10, comprenant un LTR 5' rétroviral dérivé d'un virus REV, notamment SNV, un LTR 3' rétroviral d'une origine quelconque, un ou plusieurs gène(s) d'intérêt, et une séquence nucléotidique实质iellement homologue ou identique à la séquence présentée dans l'identificateur de séquence SEQ ID NO: 2 commençant au nucléotide 1 et se terminant au nucléotide 578, ou commençant au nucléotide 265 et se terminant au nucléotide 578, à titre de région d'encapsidation.

15 17. Un vecteur selon l'une des revendications 8 à 16, comprenant un gène d'intérêt codant pour un produit d'expression sélectionné parmi le facteur VIII, le facteur IX, la protéine CFTR, la dystrophine, l'insuline, l'interféron alpha, bêta, gamma, une interleukine (IL) notamment l'IL-2 et un marqueur de sélection.

20 18. Une particule virale générée à partir d'un vecteur viral selon l'une des revendications 8 à 17.

25 19. Une cellule comprenant un vecteur selon l'une des revendications 8 à 17 ou infectée par une particule virale selon la revendication 18.

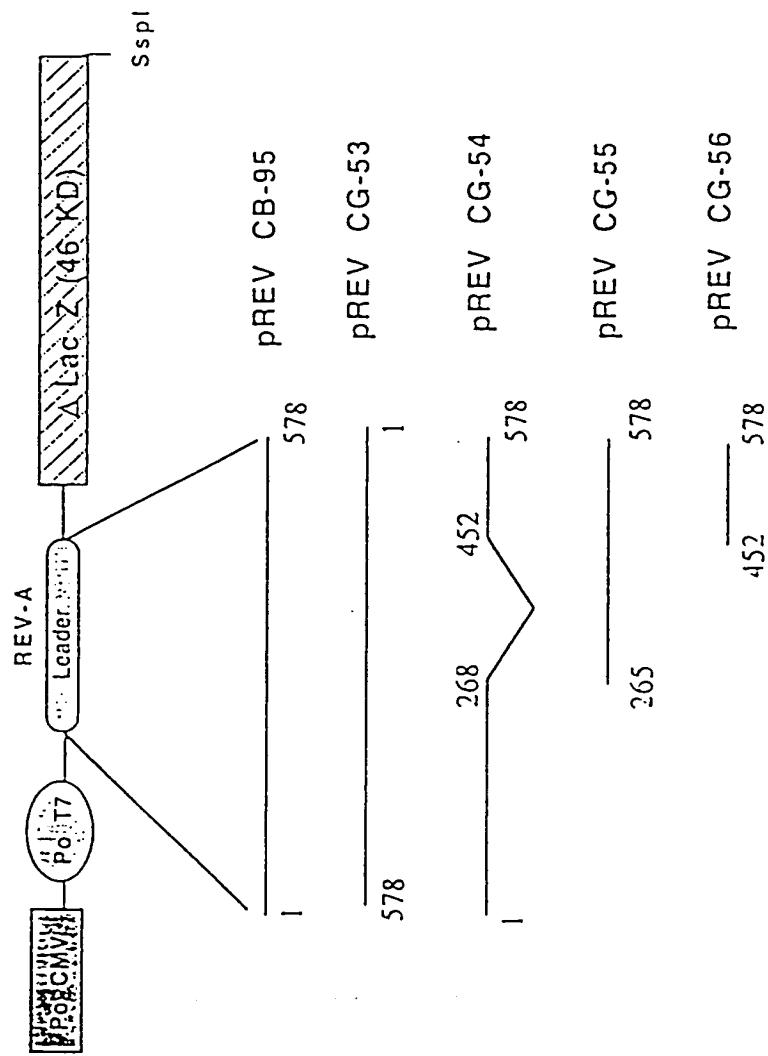
20. Utilisation d'un vecteur selon l'une des revendications 8 à 17, d'une particule virale selon la revendication 18 ou d'une cellule selon la revendication 19

- 41 -

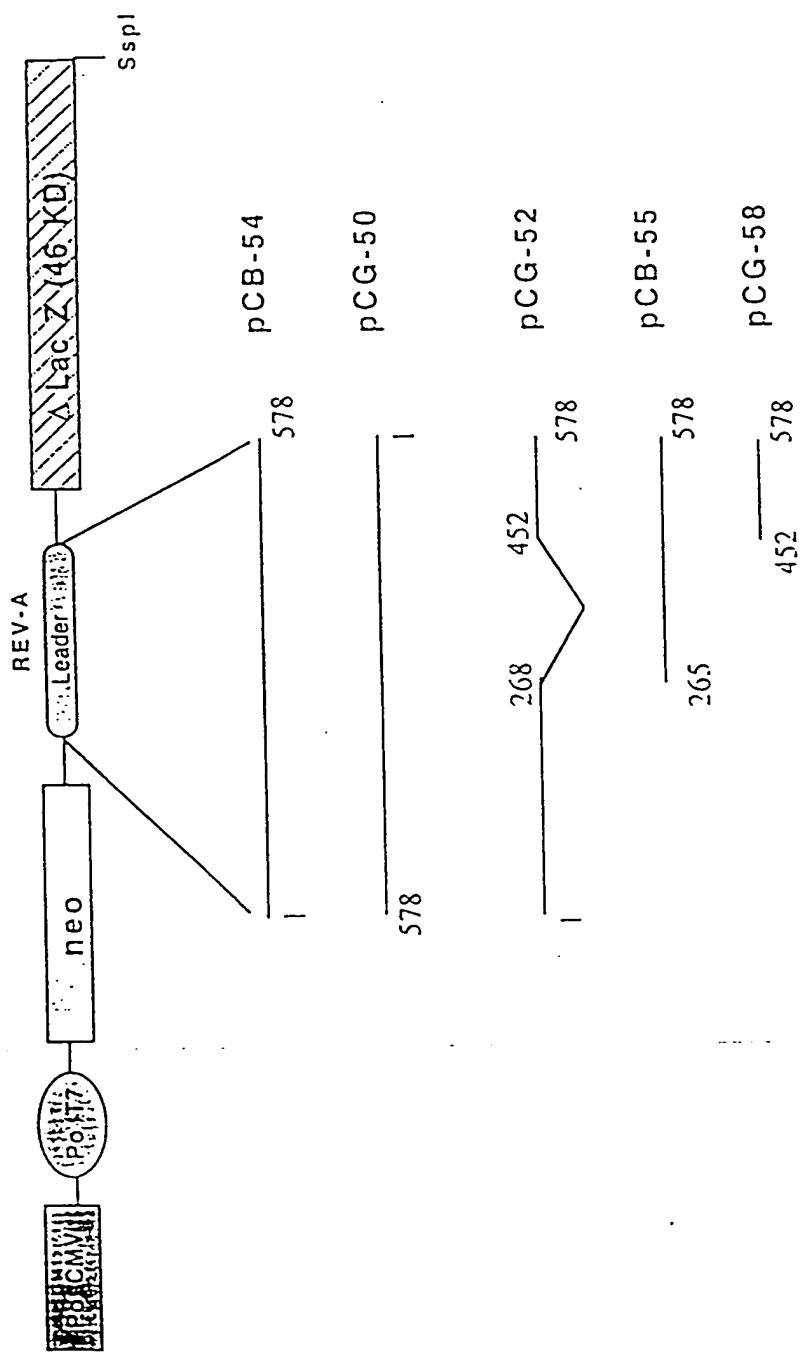
pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée au traitement et/ou à la prévention d'une maladie traitable par thérapie génique.

21. Utilisation d'un vecteur selon l'une des revendications 8 à 17, d'une particule virale selon la revendication 18 ou d'une cellule selon la revendication 19 pour la préparation d'un ou plusieurs polypeptides d'intérêt par voie recombinante ou pour la production d'un animal transgénique.
22. Une composition pharmaceutique comprenant à titre d'agent thérapeutique ou prophylactique, un vecteur selon l'une des revendications 8 à 17, une particule virale selon la revendication 18, une cellule selon la revendication 19 ou un polypeptide d'intérêt obtenu selon l'utilisation selon la revendication 21, en association avec un véhicule pharmaceutiquement acceptable.
23. Une composition pharmaceutique selon la revendication 22, caractérisée en ce qu'elle comprend entre 10^4 et 10^{14} pfu, et de préférence entre 10^6 et 10^{11} pfu particules virales selon la revendication 18.
24. Utilisation d'un vecteur selon l'une des revendications 8 à 17, d'une particule virale selon la revendication 18 ou d'une composition pharmaceutique selon la revendication 22 ou 23, pour la transfection ou l'infection de cellules pluripotentes, notamment de cellules pluripotentes du système nerveux central.

25

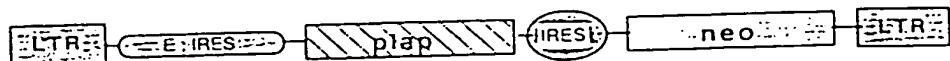


- Figure 1 -

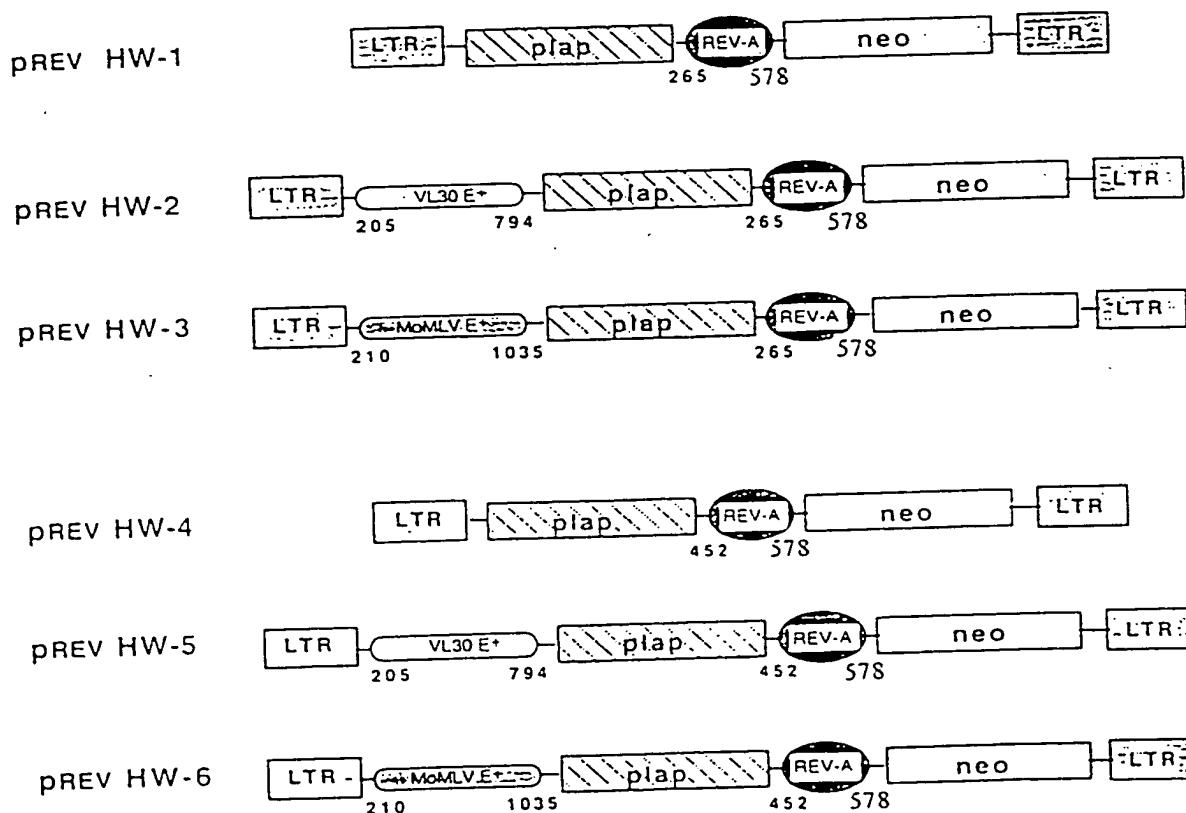


- Figure 2 -

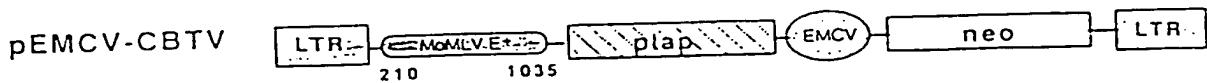
A) Structure générale des vecteurs rétroviraux



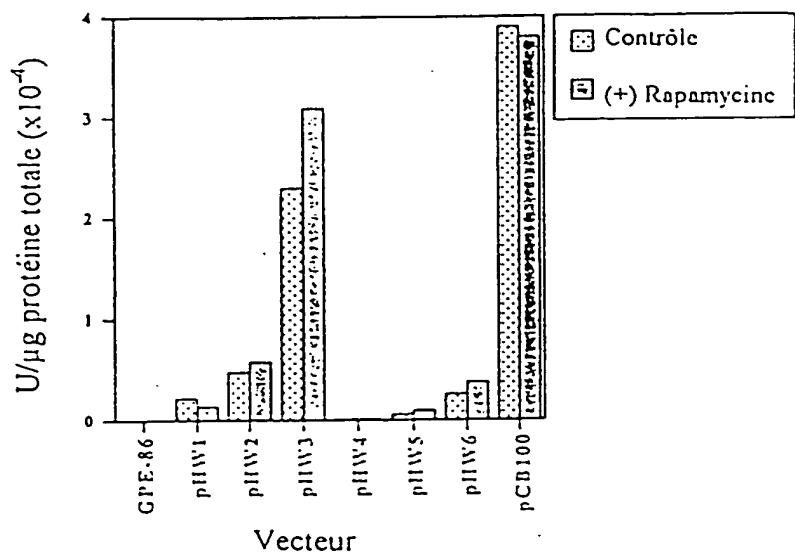
B) Nouveaux vecteurs rétroviraux dicistroniques.



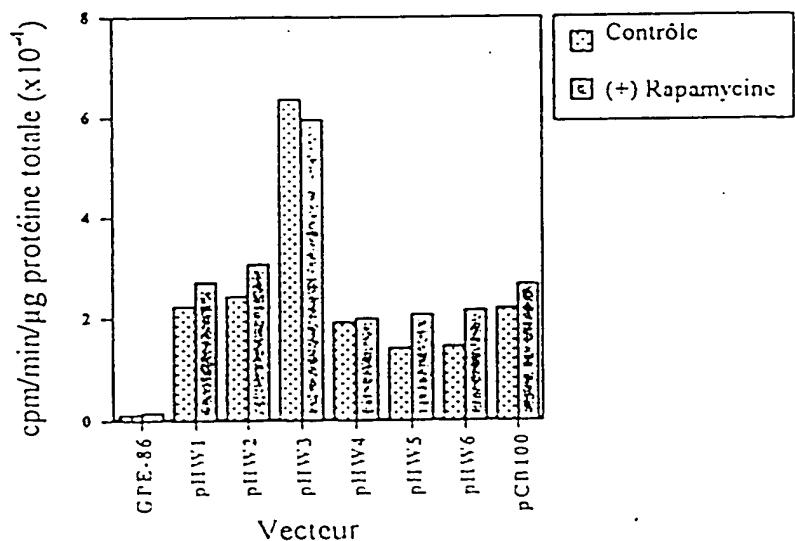
C) Vecteur de Contrôle



A) Effet de la rapamycine sur l'activité phosphatase alcaline

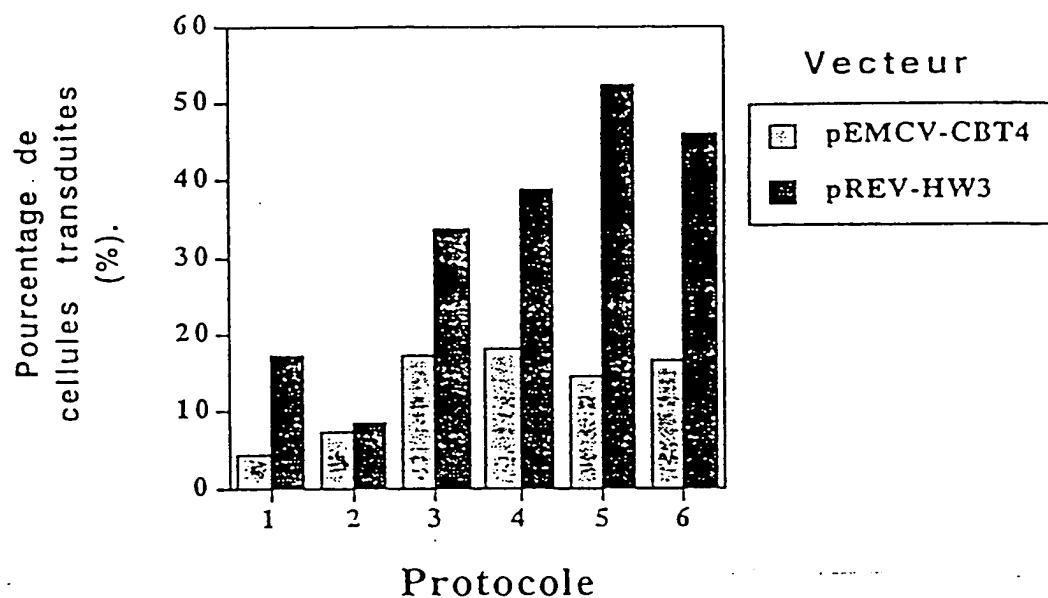


B) Effet de la rapamycine sur l'activité neomycine phosphotransférase



- Figure 4 -

5 / 5



- Figure 5 -

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

In Application No
PCT/FR 98/00849A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 6 C12N15/86 C12N15/11 //C12N15/67

According to International Patent Classification(IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 96 01324 A (INSERM) 18 January 1996	1,2, 8-11, 17-22
A	see the whole document ---	3-7, 12-15
X	WO 94 05786 A (BEIERSDORF AG) 17 March 1994 see abstract see page 5, line 9 - page 6, line 7 see page 9, line 29 - page 15, line 13 see claims 1-18 ---	1,2,8, 17-22
X	WO 94 05785 A (BEIERSDORF AG) 17 March 1994 see abstract see page 9, line 29 - page 22, line 20 ---	1,2,8, 17-22
		-/-

 Further documents are listed in the continuation of box C. Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *&* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

1 September 1998

Date of mailing of the international search report

15/09/1998

Name and mailing address of the ISA
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Panzica, G

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Ir. Application No
PCT/FR 98/00849

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 93 03143 A (ANDERSON W. ET AL.) 18 February 1993 cited in the application see abstract see page 1 - page 3 see page 5 - page 9 * revendications *	1-23
A	US 5 112 767 A (ROY-BURMAN PRADIP ET AL.) 12 May 1992 ----	13
A	WO 93 05815 A (FILLER AARON GERSHON ;LEVER ANDREW M L (GB)) 1 April 1993 ----	24
A	WO 96 15813 A (UNIV MASSACHUSETTS MEDICAL CENTER; QUESENBERRY PETER J. (US)) 30 May 1996 -----	24

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 98/00849

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)			Publication date
WO 9601324	A 18-01-1996	FR	2722208	A	12-01-1996
		AU	2929595	A	25-01-1996
		CA	2194155	A	18-01-1996
		EP	0769062	A	23-04-1997
		JP	10503644	T	07-04-1998
WO 9405786	A 17-03-1994	DE	4228457	A	28-04-1994
		AU	4953893	A	29-03-1994
		EP	0658199	A	21-06-1995
		JP	8502884	T	02-04-1996
		US	5665567	A	09-09-1997
WO 9405785	A 17-03-1994	DE	4228458	A	01-06-1994
		AU	4953793	A	29-03-1994
		EP	0658198	A	21-06-1995
		JP	8502644	T	26-03-1996
WO 9303143	A 18-02-1993	CA	2114416	A	18-02-1993
		EP	0598029	A	25-05-1994
		JP	6509713	T	02-11-1994
US 5112767	A 12-05-1992	NONE			
WO 9305815	A 01-04-1993	AU	669128	B	30-05-1996
		AU	2567992	A	27-04-1993
		CA	2119145	A	01-04-1993
		EP	0610232	A	17-08-1994
		EP	0640350	A	01-03-1995
		JP	7501793	T	23-02-1995
WO 9615813	A 30-05-1996	US	5665350	A	09-09-1997
		AU	4378996	A	17-06-1996

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

De l'Organisation Internationale No
PCT/FR 98/00849

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
CIB 6 C12N15/86 C12N15/11 //C12N15/67

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 6 C12N

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	WO 96 01324 A (INSERM) 18 janvier 1996	1,2, 8-11, 17-22
A	voir le document en entier ---	3-7, 12-15
X	WO 94 05786 A (BEIERSDORF AG) 17 mars 1994 voir abrégé voir page 5, ligne 9 - page 6, ligne 7 --- voir page 9, ligne 29 - page 15, ligne 13 voir revendications 1-18 ---	1,2,8, 17-22
X	WO 94 05785 A (BEIERSDORF AG) 17 mars 1994 voir abrégé voir page 9, ligne 29 - page 22, ligne 20 ---	1,2,8, 17-22
		-/-

Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (elle qu'indique)
- "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tout autres moyens
- "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

"&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

1 septembre 1998

15/09/1998

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Panzica, G

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

D. Internationale No
PCT/FR 98/00849

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	WO 93 03143 A (ANDERSON W. ET AL.) 18 février 1993 cité dans la demande voir abrégé voir page 1 - page 3 voir page 5 - page 9 * revendications * ---	1-23
A	US 5 112 767 A (ROY-BURMAN PRADIP ET AL.) 12 mai 1992 ---	13
A	WO 93 05815 A (FILLER AARON GERSHON ;LEVER ANDREW M L (GB)) 1 avril 1993 ---	24
A	WO 96 15813 A (UNIV MASSACHUSETTS MEDICAL CENTER; QUESENBERRY PETER J. (US)) 30 mai 1996 -----	24

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Dx. Internationale No

PCT/FR 98/00849

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)		Date de publication
WO 9601324 A	18-01-1996	FR 2722208 A		12-01-1996
		AU 2929595 A		25-01-1996
		CA 2194155 A		18-01-1996
		EP 0769062 A		23-04-1997
		JP 10503644 T		07-04-1998
WO 9405786 A	17-03-1994	DE 4228457 A		28-04-1994
		AU 4953893 A		29-03-1994
		EP 0658199 A		21-06-1995
		JP 8502884 T		02-04-1996
		US 5665567 A		09-09-1997
WO 9405785 A	17-03-1994	DE 4228458 A		01-06-1994
		AU 4953793 A		29-03-1994
		EP 0658198 A		21-06-1995
		JP 8502644 T		26-03-1996
WO 9303143 A	18-02-1993	CA 2114416 A		18-02-1993
		EP 0598029 A		25-05-1994
		JP 6509713 T		02-11-1994
US 5112767 A	12-05-1992	AUCUN		
WO 9305815 A	01-04-1993	AU 669128 B		30-05-1996
		AU 2567992 A		27-04-1993
		CA 2119145 A		01-04-1993
		EP 0610232 A		17-08-1994
		EP 0640350 A		01-03-1995
		JP 7501793 T		23-02-1995
WO 9615813 A	30-05-1996	US 5665350 A		09-09-1997
		AU 4378996 A		17-06-1996